

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月29日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/21205 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, 38/17, A61P 9/04, 9/12, 9/10, 3/06, 3/10, 11/00, 1/04, 7/00, 9/10, C12N 15/12, G01N 33/53
岩木町大字駒越字村元31番1号 Aomori (JP). 孫田浩二 (MAGOTA, Koji) [JP/JP]; 〒569-1118 大阪府高槻市奥天神町2-14-38 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05210 (74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2000年8月3日 (03.08.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, HU, JP, KR, US.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) 優先権データ: 特願平11/264687 1999年9月17日 (17.09.1999) JP 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka (JP).
2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長内智宏 (OSANAI, Tomohiro) [JP/JP]; 〒036-1322 青森県中津軽郡

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/21205 A1

(54) Title: COUPLING FACTOR 6 INHIBITOR AND POTENTIATOR AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: カップリングファクター6阻害剤および賦活剤ならびにその用途

(57) Abstract: Methods of determining the presence/absence of coupling factor 6 (CF6), which is a subunit of a proton-translocating ATPase occurring in mitochondria, in blood and measuring the concentration of the factor in blood by using a CF6 antibody, etc.; and techniques of treating various diseases by clarifying the relationships of the changes in the concentration of the factor in blood, production of prostacyclin in association with these changes, cPLA₂ activity, etc. with the diseases to thereby inhibit or potentiate the factor and diagnosing various diseases based on these findings. A process of efficiently producing CF6 or its fragment by using a vector containing a DNA encoding CF6 or its fragment.



(57) 要約:

本発明は、ミトコンドリアに存在するプロトン輸送性ATP合成酵素のサブユニットであるカップリングファクター6 (CF6)の血液中での存在の有無、及び、CF6抗体等を用いた当該ファクターの血中濃度の測定方法を提供する。また、当該ファクターの血中濃度の変化、当該変化に伴うプロスタサイクリン産生、cPLA₂活性等と各種疾患との関係を明らかにし、当該ファクターを抑制又は賦活することによって当該各種疾患を治療し、また、当該知見に基づいて各種疾患を診断する技術を提供する。

さらに、CF6又はその断片をコードするDNAを含むベクターを用いてCF6又はその断片を効率的に製造する方法も提供する。

AVAILABLE
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/17,
A61P9/04, 9/12, 9/10, 3/06, 3/10, 11/00, 1/04, 7/00, 9/10,
C12N15/12, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/17, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN) , BIOSIS (STN) , EMBASE (STN) , MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	OSANAI T. et.al. "A novel inhibitory effect on prostacyclin synthesis of coupling factor 6 extracted from the heart of spontaneously hypertensive rats.", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol.273, No.48(1998), PP.31778-31783 whole document, especially DISCUSSION and ABSTRACT	1-12 14, 15
X Y	US, 5849527, A (Incyte Pharmaceuticals, Inc.), 15 December, 1998 (15.12.98), (No Family) whole document, especially column 16, lines 54-64 and sequences	1-3 14-16
Y	ANDO J. et. al., "Differential display and cloning of shear stress-responsive messenger RNAs in human endothelial cells.", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol.225, No.2 (1996), PP.347-351, whole document, especially ABSTRACT and from P.348 line 50 to P.349 line 2	14, 15
Y	EVANS A. et. al., "An import-competent precursor of small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
11 October, 2000 (11.10.00)

Date of mailing of the international search report
24 October, 2000 (24.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05210

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	generated by factor Xa cleavage from a .beta.-galactosidase fusion expressed in Escherichia coli.", Protein Expression Purif., Vol.3, No.3(1992)P. 178-84, whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05210

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13,17-20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13 and 17 to 20 pertain to diagnostic methods practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☒ Claims Nos.: 1-12
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
In these claims, "a CF6 inhibitor, a CF6 potentiator, a CF6 agonist, a CF6 antagonist and a CF6-secretion promoter" are described as the active ingredient. However, those skilled in the art could not understand these substances except those particularly disclosed in the description, considering the common general technical knowledge at the filing date of the present application. Therefore, no meaningful international search can be practiced.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 15 and 17 to 20 pertain to remedies and diagnostics containing as the active ingredient a CF6 antibody, a CF6 agonist, etc. In contrast, the invention as set forth in claim 16 pertains to a process of producing CF6 or its peptide fragment. These two groups of inventions have nothing in common but CF6 and/or substances concerning thereto.

As the applicant has admitted in the description, the CF6 peptide had been publicly known and, therefore, cannot be regarded as a technical feature of the present application.

Such being the case, it is recognized the present application involves two or more inventions.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

明細書

カップリングファクター6阻害剤および賦活剤ならびにその用途

5 [技術分野]

- 本発明は、血液中のカップリングファクター(CF6)濃度が変化した疾患、 PGI_2 の過剰または不足している疾患、ならびに cPLA_2 作用の亢進または減弱している疾患において、疾患の発症、進展を判断するための診断方法および診断助剤、ならびに該疾患に対する治療薬に関する。また、本発明は、CF6 またはその部分ポリペプチドをコードする
- 10 DNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体およびCF6およびその部分ポリペプチドの効率的な製造方法、CF6 に特異的に反応する抗体およびその製造方法、CF6 の測定方法に関する。

[背景技術]

- 15 アラキドン酸カスケードを経て産生される、プロスタグランジン(PG)、トロンボキサン(TX)およびロイコトリエン(LT)のようなプロスタノイドは、生体の恒常性維持に必要な生理活性物質である。プロスタノイドの一員であるプロスタサイクリン(PGI_2)は、血管内皮細胞において、シクロオキシゲナーゼ、プロスタグランジン H_2 (PGH_2) 合成酵素によりアラキドン酸から生成された PGH_2 に、さらに PGI_2 合成酵素が働き、生成される。
- 20 この PGI_2 の薬理作用に関しては、(1) PGI_2 は膜上の PGI_2 レセプターに結合してアデニルシクラーゼを活性化させcAMPを生成することによって、血小板凝集抑制作用、血管拡張作用を示す(中畑ら薬局50:1365-1373、1999))こと、
- (2) PGI_2 は血管の内皮障害に起因する血栓形成に重要な役割を果たす(Murata, T. et al. Nature 388:678-682、1997)こと、
- 25 (3) PGI_2 は炎症浮腫を引き起こす主要なプロスタノイドである(Murata, T. et al. Nature 388:678-682、1997)こと、などが知られている。

このように、 PGI_2 の生合成経路と生合成に関与する酵素群(アラキドン酸カスケード)が同定され、 PGI_2 の生理活性作用はある程度判ってきた。しかしながら、疾患における PGI_2 産生制御の機序については知られていない。

BEST AVAILABLE

一方、 PGI_2 の産生制御に関しては、高血圧自然発症ラット (SHR) を用いた実験によって、SHR には内因性 PGI_2 産生抑制物質が存在することが示唆されていた (Osanai, T. et al. Jpn. Circ. J. 54, 507-514, 1990、Falardeau, P. et al. Prostaglandins, 29, 621-628, 1985)。この内因性 PGI_2 産生抑制物質に関しての検討は、未だ充分ではないが、発明者らは、SHR の腸管膜動脈由来平滑筋細胞が分泌する PGI_2 産生を抑制する因子を、SHR の心臓から単離精製することに成功した。さらにその構造を決定し、この因子が H^+ 輸送性 ATP 合成酵素のサブユニットの一つであるラット CF6 (以後 rCF6 と記す) であることを解明した (参考例1)。

哺乳類の H^+ 輸送性 ATP 合成酵素は、ミトコンドリア内膜に存在し、少なくとも14のサブユニットからなる。CF6 は該酵素のサブユニットの一つであり、76アミノ酸からなる。CF6 は N 末端に、ミトコンドリア移行配列を含む 32 アミノ酸が付加したペプチドとして合成される (Higuchi, T. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178 793-799, 1991)。

これまでに本発明者らは、ファクター Xa により rCF6 が切り出し可能なキメラタンパク質を大腸菌を宿主として発現させ、キメラタンパク質から rCF6 を切り出し、精製する方法を確立した (参考例2)。

更に本発明者らは、CF6 による PGI_2 産生阻害の作用点は PLA_2 阻害 (参考例3)、特に、 cPLA_2 阻害であること (参考例4) を明らかにした (Osanai, T. et al. J. Biol. Chem. 273, 31778-31783, 1998)。しかし、細胞内のペプチドである CF6 と疾患の関係に関しては全く知られておらず、CF6 がイン・ビボにおいて血管内皮に作用する状態、すなわち血液中に存在するか否かについてすら不明であった。

また、一方で、 cPLA_2 の機能については、

- (1) アラキドン酸カスケードの炎症メディエーターであるプロスタグランジン E_2 、ロイコトリエン B_4 、ロイコトリエン C_4 の産生に必須であること、
 - (2) 該酵素欠損マウスでは、中脳動脈の一過性の結紮後の梗塞領域が小さく、脳の浮腫や神経欠落も少ないこと、
- が明らかになってきた (Bonventre JV, T. et al. Nature 390:622-625, 1997)。このことから、 cPLA_2 の阻害薬は、強力な炎症治療薬や脳梗塞などの治療薬になると推測されているが、有効な治療薬や、CF6 作用の制御に基づく cPLA_2 阻害薬のスクリーニング

方法は未だ見出されていない。

このように、アラキドン酸カスケードにおける PGI_2 の生合成や生理作用、 cPLA_2 の生理作用、および PGI_2 や cPLA_2 とCF6との関係については、徐々に解明されてきた。しかし、アラキドン酸カスケードの末端に位置する PGI_2 や、初端に位置する cPLA_2 といった因子

- 5 が関与する疾患の原因については、解明が進んでいない。

[発明の開示]

- 本発明者らは、ラットおよびヒト血液中に CF6 が存在すること、CF6 は血管内皮細胞から産生されることを明らかにした。また、 PGI_2 が不足した高血圧症において血圧の上
- 10 昇とともに血中rCF6 濃度が増加すること、この状態においてrCF6 を投与すればさらに血圧が上がることを明らかにした。さらに、ヒト急性心筋梗塞において、血中 CF6 濃度が上昇し、ヒト疾患においても血中 CF6 濃度が変化するという知見を得て本発明を完成するに至った。

- 15 本発明は、上述のような実状に鑑み、CF6 の血中濃度を調節することにより、血液中の CF6 量の変化に起因する疾患、 PGI_2 の過剰または不足している疾患、ならびに cPLA_2 作用の亢進または減弱している疾患の予防薬または治療薬及びこれら疾患において、疾患の発症、進展を判断するための診断方法および診断助剤に関する。

- すなわち、本発明によれば、CF6、CF6 分泌促進物質及び CF6 アゴニストのような
- 20 CF6賦活剤、または、CF6 分泌抑制物質及び CF6 アンタゴニストのような CF6 阻害剤を有効成分とする、CF6 濃度が増加または減少している、 PGI_2 濃度が増加または減少している疾患、ならびに cPLA_2 作用の亢進または減弱している疾患の予防薬または治療薬が提供される。また、血中の CF6 濃度の測定方法が提供される。さらに、CF6 濃度が増加または減少している疾患の診断方法及び診断助剤が提供される。

- 25 また、本発明によれば、上記疾患の予防薬や治療薬の有効成分である CF6 分泌促進物質、CF6 分泌抑制物質、CF6 アゴニストまたは CF6 アンタゴニストが提供される。さらに、血中 CF6 濃度の測定方法または診断方法の試薬または診断助剤として用いられる抗 CF6 抗体が提供される。また、本発明は CF6 をコードする DNA を含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および CF6 様ペプチドの製造方法に関する。本

発明によれば、CF6 や CF6 の部分ポリペプチドに特異的に反応する抗体およびその製造方法が提供される。

[図面の簡単な説明]

- 5 図1は、ラット肝臓cDNAライブラリーまたはヒト腎臓cDNAライブラリーから、rCF6またはヒトCF6(hCF6)をエンテロキナーゼにより切り出すことが可能なキメラタンパク質として発現するためのベクターの構築を示す図である。

図2は、発現したrCF6含有キメラタンパク質をエンテロキナーゼで処理した溶液のC18-HPLCの溶出曲線である。

- 10 図3は、粗精製rCF6のC18-HPLCの溶出曲線である。

図4は、発現したhCF6含有キメラタンパク質をエンテロキナーゼで処理した溶液のC18-HPLCの溶出曲線である。

図5は、粗精製rCF6のC18-HPLCの溶出曲線である。

- 図6は、rCF6から誘導された免疫抗原をウサギに投与して作成された抗血清、及び
15 抗体ペプチドを結合させたアガロースゲルアフィニティーカラムにて精製した抗体の電気泳動ゲルの結果を示す図である。

図7は、抗rCF6抗体がSHR(16週齢)の血圧に与える影響を示すチャートである。

図8は、抗rCF6抗体がラット(SHR、WKY、16週齢)の血圧に与える影響を示すグラフである。

- 20 図9は、抗rCF6抗体の前投与が、ブラジキニンによるラット(SHR、16週齢)血圧低下に与える影響を示すチャートである。

図10は、抗rCF6抗体の前投与が、ブラジキニンによるラット(SHR、WKY、16週齢)血圧低下に与える影響を示すグラフである。

- 図11は、rCF6 がラット(SHR、WKY、16週齢)の血圧に与える影響を示すチャート
25 である。

図12は、SHRの心臓からの沸騰水抽出液を、セファデックスG-25で分画したチャートである。

図13は、上記図12の活性画分をHPLCにかけて得られたチャートである。

図14は、上記図13の活性画分をHPLCにかけて得られたチャートである。

図15は、ラット大動脈cDNAライブラリーから、ファクターXaの認識配列がN末端に付加されたrCF6を含むタンパク質発現用ベクターの構築を示す図である。

図16は、rCF6によるPGI₂の産生抑制を示すグラフである。

図17は、ブラジキニン存在下におけるrCF6によるの産生抑制を示すグラフである。

- 5 図18は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) からのアラキドン酸遊離に対するrCF6の影響を示すグラフである。

図19は、ブラジキニンによる HUVEC からのアラキドン酸遊離作用に対するrCF6の影響を示すグラフである。

- 図20は、各種 PLA₂ 阻害薬およびrCF6が HUVEC からのアラキドン酸遊離に対する
10 影響を示すグラフである。

図21は、各種 PLA₂ 阻害薬およびrCF6が、ブラジキニンによる HUVEC からのアラキドン酸遊離に対する影響を示すグラフである。

図22は、rCF6 がラット (SHR、WKY、16 週齢) の血圧に与える影響を示すグラフである。

- 15 図23は、健常人と急性心筋梗塞患者の血中hCF6濃度の比較示すグラフ示すグラフである。

図24は、急性心筋梗塞患者の血中hCF6濃度の推移を示すグラフである。

図25は、HUVEC 培養液中のhCF6 濃度の推移を示すグラフである。

20 [発明の実施の形態]

(CF6の製造)

- 本発明において、上記の予防薬や治療薬の有効成分、または、血中の CF6 濃度の測定方法または血中の CF6 濃度が変化する疾患の診断方法の試薬または診断助剤として用いられるラットおよびヒト CF6は、切り出し酵素としてエンテロキナーゼを用いること
25 で、従来法(参考例2)に比して効率よく製造できる。エンテロキナーゼは、Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 配列(配列番号3)を認識し、そのC末端のペプチド結合を切断する酵素である。CF6 を取得するには、遺伝子組換え技術の常法により、エンテロキナーゼの認識配列の N 末端に保護ペプチドを、C 末端に CF6またはその部分ペプチドを有するキメラタンパク質を得て、エンテロキナーゼによりCF6を切り出す。キメラタンパク質としては、

例えば大腸菌 β -ガラクトシダーゼのN末端139アミノ酸からなるペプチド(76番目と122番目のアミノ酸システインがセリンに置換している:配列番号4)のC末端に、エンテロキナーゼの認識配列を介してCF6を結合したペプチドを用いることができる。このキメラタンパク質は、大腸菌で不溶性分画に大量に蓄積されるため、効率よく、発現、精製

5 することができる。CF6は、不溶性のキメラタンパク質を尿素溶液に可溶化後、エンテロキナーゼを作用させキメラタンパク質から切り出すことができる。CF6は、これをC18カラムを接続したHPLCに供し、精製できる。発現ベクターの作成、宿主の形質転換は当業者において常法により行うことができる(マニアティスら "モレキュラークローニングアラボラトリーマニュアル"コールドスプリングハーバーラボラトリー1989年)。

10 (部分ポリペプチド)

本発明でいう部分ポリペプチドとは、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)からの PGI_2 産生抑制作用を有するCF6の一部分からなるポリペプチドである。また、CF6の一部分を構成するポリペプチドに対して、1ないし数個のアミノ酸が欠損、1ないし数個のアミノ酸が付加、および、1ないし数個のアミノ酸が置換、並びにこれらの組み合わせにより修飾

15 された、HUVECからの PGI_2 産生抑制作用を有するポリペプチドを含む。

(CF6抗体の製造)

本発明において、上記の予防薬や治療薬の有効成分、または、血中のCF6の濃度の測定方法または診断方法の試薬または診断助剤として用いられる、CF6に対して免疫

20 細胞を免疫原として、動物、好ましくはヒト以外の動物を、通常の実験法を用いて感作することにより得ることができる。モノクローナル抗体を調製する場合には、連続的細胞系培養により産生される抗体を提供するハイブリドーマ法(Kohler、G. et al. Nature、256:495-497、1975)等を用いることができる。一本鎖抗体の産生に用いる技術(米国特許第4946778号)を適用して、CF6対する一本鎖抗体を産生できる。また、ヒトの抗

25 体産生系を有するトランスジェニックマウス(Green LL. et al. Nat Genet、7、13-21、1994)を用いて、ヒト型抗体を発現させることができる。本明細書には、rCF6由来またはhCF6由来の約20アミノ酸からなる断片のN末端にシステインを付加したペプチドを合成し、N末端のシステインを介してキーホールリンペットヘモシアニンと結合させたものを抗原としてウサギを免疫し、ポリクローナル抗体を作製した例を示した(実施例2)。

(CF6濃度の測定方法)

また、本発明は、前述の抗体を用いることで、RIA 法またはELISA法により試料中のCF6 の測定方法を設定することが可能である(ラジオイムノアッセイ:北川p79-88、エンザイムイムノアッセイ:p88-99、新生化学実験講座12、分子免疫学III、抗原、抗体、
5 補体、日本生化学会編集1992)。その例として、本明細書では実施例2に、¹²⁵Iラベル化抗原と抗体との反応を、サンプル中の抗原により阻止することによって定量する拮抗阻害系(RIA 法)を示している。

(CF6分泌促進物質または CF6分泌阻害物質質のスクリーニング方法)

また、本発明は、前述のCF6濃度の測定方法を用いることで、CF6分泌促進物質また
10 は CF6分泌抑制物質を得ることができる。具体的には、CF6を分泌する細胞、例えば、HUVEC 培養液中に、被験物質を添加し、培養液中に分泌されるCF6量を抗CF6抗体を用いた測定系、例えば、前述の RIA 法により測定し、CF6量が増加するCF6分泌促進物質やCF6量が減少する分泌抑制物質を得ることができる(実施例7)。CF6を分泌する細胞は、疾患の原因となる細胞を用いることがさらに望ましい。

15 (CF6 アゴニストまたは CF6 アンタゴニストのスクリーニング方法)

また、本発明は、CF6 アゴニスト、または CF6 アンタゴニストを見出すためのスクリーニング方法が得られる。

具体的には、CF6によりPGI₂ 産生量が抑制される細胞、例えば、HUVEC やラット腸管大動脈由来の平滑筋細胞培養液中に、被験物質をCF6と共に添加し、培養液中に
20 分泌されるPGI₂ の安定代謝物である6-ケート-PGF1 α 量を測定し、6-ケート-PGF1 α 量が増加するCF6アンタゴニストや6-ケート-PGF1 α 量が減少するアゴニストを得ることができる。また、標識したアラキドン酸存在下で、HUVEC 培養液中に被験物質をCF6と共に添加し、培地中に遊離されるアラキドン酸を測定し、アンタゴニストやアゴニスト見いだしてよい。PGI₂ 産生細胞やアラキドン酸遊離は、疾患の原因となる細胞を用いる
25 ことがさらに望ましい。

(CF 6 結合レセプターの同定方法)

また、本発明は、CF 6 結合レセプターの同定方法を提供する。CF 6 結合レセプターは、CF 6 を用いて、当該分野において既知の標準的なレセプター結合法により、同定することができる。これらの方法は、リガンド結合およびクロスリンキングアッセイを包含す

- るが、これらに限らない。これらの方法において、CF6 は放射性標識(例えば 125I)、化学修飾(例えばビオチン化)または検出もしくは精製に適したペプチド配列に融合され、HUVEC等の細胞の膜画分とともにインキュベーションされる。また、標識されたCF6は、結合アッセイを用いて、CF6 のそのレセプターへの結合と競争する CF6 のアゴニストおよびアンタゴニストを同定する方法にも利用できる。このようなアッセイを行うための標準的方法は当該分野において周知である。

(疾患例)

- 本発明でいう CF6 が過剰な疾患とは、血中 CF6 作用が生体にとって望ましくない状態にまで亢進した疾患であり、必ずしも血中 CF6 濃度が健常人のそれに比べて高い疾患に限定されない。例えば、PGI₂ が不足した疾患やcPLA₂作用の減弱した疾患があげられる。その例としては、血小板凝集が亢進した疾患あるいは血管拡張抑制による末梢循環障害を伴う疾患、心筋梗塞、狭心症、心不全、肺高血圧、高血圧症、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、動脈硬化、高脂血症、糖尿病、気管支疾患、胃潰瘍、妊娠子癇、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病がある。
- 15 本発明でいう CF6が不足している疾患とは、血中 CF6 作用が生体にとって望ましくない状態にまで低下した疾患であり、必ずしも血中 CF6 濃度が健常人のそれに比べて低い疾患に限定されない。例えば、PGI₂ が過剰した疾患やcPLA₂作用が亢進した疾患があげられる。その例としては、脳梗塞、急性膵炎、喘息、ARDS、慢性関節リウマチを含む炎症性疾患がある。

20 (治療薬の提供)

本発明によれば、血液中 CF6 量が、過剰または不足である上記のような症状の治療薬を提供することができる。

- CF6 活性が過剰な場合、例えば、リガンド、基質、レセプター、酵素等への CF6 の作用を阻害するのに効果的な量のアンタゴニスト、あるいは、CF6分泌抑制物質を投与することで、CF6 活性を低減することができる。これらアンタゴニストおよび CF6分泌抑制物質は、上記のスクリーニング方法により得る事ができる。
- 25

一方、CF6の不足している異常な症状を治療するために、リガンド、基質、レセプター、酵素等への CF6 の作用を促進するのに効果的な量のアゴニストを投与すること、あるいは、CF6分泌促進物質を投与することで CF6 活性を増強することができる。これらアゴ

ニストおよび CF6 分泌促進物質は、上記のスクリーニング方法により得る事ができる。

(製剤の製造方法)

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる CF6 分泌促進物質、CF6 分泌抑制物質、CF6 アゴニストまたは CF6 アンタゴニストを医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて皮膜を施した錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤などの固形剤として、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液に溶解または懸濁させた注射剤、点眼剤または経鼻剤として、あるいは軟膏剤、ハップ剤といった外用剤として使用できる。

これらの製剤は通常用いられる添加剤を使用して通常の操作によって製造できる。錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤などの経口投与用の固形剤を製造する場合、添加剤として、例えば、(1)乳糖、デンプンまたは結晶セルロースなどの賦形剤、(2)ヒドロキシプロピルセルロースやポリビニルピロリドンのような結合剤、(3)デンプン、クロスカルメロースナトリウムのような崩壊剤、(4)マクロゴールやクエン酸トリエチルのような可塑剤、(5)ステアリン酸マグネシウムやタルクのような滑沢剤、(6)ヒドロキシプロピルメチルセル
15 ロース、オイドラギットなどのコーティング基剤、(7)白糖やマンニトールのような矯味剤の他、矯臭剤、着色剤などを用いることができる。

また、注射剤、点眼剤または経鼻剤を製造する場合は、添加剤として、(1)塩化ナトリウム、D-マンニトール、D-ソルビトールなど等張化剤、(2)塩酸、クエン酸などの pH 調整剤、(3)クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、ホウ酸などの緩衝剤、(4)塩酸プロカイ
20 ンなど無痛化剤の他、安定化剤や界面活性剤を添加することができる。また、有効成分の安定性などを考慮して、用時溶解または用時懸濁して使用する製剤とするか、または液剤とするかを選択することができる。

軟膏剤、ハップ剤といった外用剤の製造には、(1)流動パラフィン、ワセリン、親水軟膏など基剤、(2)ポリソルベート 80、トラガントなどの乳化剤、(3)安息香酸ナトリウム、パラ
25 オキシ安息香酸プロピルなどの保存剤、(4)塩酸プロカインなど無痛化剤の他、安定化剤や界面活性剤を添加することができる。

調製された製剤は各剤形ごとに適した形態で包装される。例えば、瓶包装、分包、PTP 包装、アンプル、バイアルにといった包装形態をとることが可能である。このようにして得られる製剤は、例えば哺乳動物(ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、

ヒトなど)に対して投与することができる。投与量は、適応症、症状や投与経路などにより差異はあるが、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~300mg、好ましくは約0.1~100mgである。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

5 (診断方法)

また、本発明によれば、採取した血液サンプル中の CF6 濃度を測定することにより、CF6濃度が増加または減少した疾患の診断方法を提供する。CF6濃度は上述のように、抗体を用いた RIA 法またはELISA法により測定することが可能である。

(CF6 遺伝子またはmRNA)

- 10 本発明によれば、CF6 の過少発現、過剰発現、局在の変化、またはこれらの変化よりもたらされる疾患に対しての診断薬または診断助剤として使用可能な CF6 遺伝子またはmRNAを使用することができる。

CF6 遺伝子に変異のある個体は、種々の方法によりDNAレベルで検出できる。診断に供する核酸は、対象の細胞、例えば、血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料より

- 15 得ることができる。ゲノムDNAは、直接使用してもよく、または分析の前にPCRもしくはその他の増幅法を用いることにより増幅させてもよい。mRNAまたはcDNAもまた同じ方法で用いることができる。正常な遺伝子型との比較における増幅産物の大きさの変化により、欠失および挿入を検出できる。点突然変異は、増幅DNAを正常な DNA 塩基配列を有する CF6DNA とハイブリダイズさせることにより同定できる。完全に対合した配列
- 20 はRNase消化により、または融解温度の違いにより、誤対合二重らせんから区別できる。

DNA配列の違いはまた、変性物質と一緒にまたは単独で電気泳動したときのDNA断片のゲル中での移動度の変化により、または直接DNA配列決定により検出できる。特異的な位置での配列の変化は、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNaseおよびS1保護または化学的切断法によっても明らかにすることができる。あるいは、CF6の塩基配列

- 25 またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイ(array)を構築して、例えば遺伝的変異の効果的なスクリーニングを行うことができる。アレイ法は周知であり、適用範囲が広く、その方法を用いて、遺伝子発現、遺伝的連鎖および遺伝的变化を含め、分子遺伝学における種々の問題に取り組むことができる。

〔実施例〕

以下に本発明を実施例をもってより具体的に示すが、これは本発明の実施態様の一つの例示であり、本発明はこれに限定されるものではない。なお、実施例中の学術用語、略号等は特に断らない限り当該技術分野で一般的に使用されているものに従った。本

- 5 発明のための材料として用いたプラスミド、大腸菌および、各実施例に共通な基本的な実験操作を参考のために示した。また、本発明の基礎となった従来技術及び本発明の付帯技術を確認し、説明するために参考例を示した。

(プラスミド)

- プラスミドpG97S4DhCT[G]は、 β -ガラクトシダーゼのN末端から97番目までのア
10 ミノ酸からなるペプチド(配列番号5:76番目のシステイン残基がセリン残基、40、41、71、と75番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換されている: β Gal-97S4Dと呼ぶ)に Glu-Phe-Glu 配列を介してhCT[G](ヒトカルシトニンの32番目のアミノ酸のC末端にグリシンが付加したペプチド)が結合したキメラタンパク質を大腸菌ラクトースオペロンのプロモーターにより発現できるプラスミドである。このプラスミドによる形質転換株は、
15 テトラサイクリン薬剤耐性で選択できる。目的とするペプチドをコードするDNA領域を読み枠を合わせてEcoRI-Sal I DNA断片として導入すれば、 β Gal-97S4Dとのキメラタンパク質を発現することができる。なお、このプラスミドを含有する大腸菌W3110株は、*Escherichia coli*SBM323と命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号:微工研条寄第3503号(FERMBP-3503)として1991年8月8日に寄託されてい
20 る。

- プラスミドpGP#19RIは、pG97S4DhCT[G]の β Gal-97S4D/hCT[G]キメラタンパク質をコードする遺伝子が、 β Gal-139S(配列番号4)/hProPTH キメラタンパク質をコードする遺伝子に置換したプラスミドである。目的とするペプチドをコードするDNA領域を読み枠を合わせてEcoRI-Sal I DNA断片として導入すれば、 β Gal-1
25 39Sとのキメラタンパク質を発現することができる。プラスミドpGP#19(特開平9-296000;図4)の保護ペプチド β Gal-139SとhProPTHの結合部分をコードするDNA部分にEcoRI部位を挿入し作製できる。

プラスミドpCRIIは、Taq DNAポリメラーゼを用いたPCR法にて増幅したDNA断片と直接連結できる形でインビトロジェン(株)より購入した。プラスミドpCRIIによる形質転

換株は、アンピシリン薬剤耐性で選択できる。

(大腸菌と培地)

大腸菌JM109株は東洋紡(株)から購入し、プラスミドの調製およびキメラタンパク質発現に利用した。

- 5 培地には、LB培地(0.5%(w/v)酵母エキス、1%(w/v)トリプトン、0.5%(w/v) NaCl)、SB培地(2%(w/v)酵母エキス、1%(w/v)トリプトン、0.5%(v/v)グリセロール、1.2%(w/v) K_2HPO_4 、0.3%(w/v) KH_2PO_4)を用いた。

(基本的な実験操作)

具体的に実施例に示さない場合は、実験操作は以下の方法に従った。DNA塩基配

- 10 列はジデオキシ法/DNAシーケンサー373(アプライドバイオシステムズ(株))で決定した。制限酵素によるDNAの切断は購入先の指定する3~10倍量の酵素を用いて1時間反応させた。プラスミド構造の解析は0.5~1 μ g DNAを用いて20 μ L 反応液中で、DNAの調製には3~10 μ gのDNAを用いて50~100 μ L 反応液中で行った。反応温度、反応バッファー等の条件は購入先の指定に従った。得られたDNA断片はアガ
- 15 ロースゲル電気泳動にて分離し、解析または調製した。

アガロースゲル電気泳動サンプルは、反応液に1/5容量の色素液(0.25%(w/v)ブロムフェノールブルーを含む15%(w/v) Ficoll水溶液)を加え調製した。アガロースゲル電気泳動用バッファーにはTAEバッファー(10mMトリス、20mM酢酸、2mMEDTA・Na、pH6.8)を用いた。プラスミドの構造解析、およびDNA断片調製にはMupid-

- 20 2(コスモバイオ(株))を用いて100ボルト1時間の泳動を行なった。ゲルはエチジウムブロミド水溶液(0.5 μ g/ml)で20分染色した後、紫外線照射してDNAバンドを検出した。アガロースゲル濃度は、分画するDNA断片の大きさに合わせて、1.0、1.5、2.0%(w/v)を用いた。アガロースゲル中のDNAは、SUPREC-01(宝酒造(株))を用いてゲルから抽出した。DNA溶液はフェノール処理後、エタノール沈殿を行った。
- 25 ゲーション反応は、0.05~1 μ gのDNA断片を用い、TAKARA Ligation Kit(宝酒造(株))を用いて行なった。

大腸菌の形質転換法は塩化カルシウム法で行い(JM109株はコンピテントな細胞を購入して使用)、形質転換株は薬剤耐性(アンピシリンまたはテトラサイクリン)で選択した。

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)は、Laemmliの方法に準じた

(Laemmli et al. Nature 227, 680-685, 1970)。すなわち、試料に1/4容量の4×SDSサンプルバッファー(375mMトリス塩酸(pH6.8)、30%(v/v)グリセロール、7%(w/v)SDS、15%(v/v)2-メルカプトエタノール、0.1%(w/v)ブロムフェノールブルー)を加え、95℃、5分間加熱した。10μLをSDS-ポリアクリルアミドゲル(55
5 mm x 85 mm x 1 mmまたはテフコ(株))に供し、20mA、80分間の電気泳動を行った。泳動後、ゲルを染色液(10%(v/v)酢酸、40%(v/v)メタノール、0.25%(w/v)クマジーブリリアントブルーR250)で染色した。

C18カラムを用いたHPLCを用いたペプチドの解析および精製は、YMC-ODS-A302(d4.6mmX150mm)カラム、YMC-ODS-A323((d10mmX250mm)カラム(以
10 上ワイエムシー(株))、InertsilODS-2 C18(d4.6mmX250mm)カラム(GLサイエンス(株))を接続したHPLC(島津製作所(株)LC10A)を用い、A液(0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸(TFA)、B液(0.092%(v/v)TFA/80%(v/v)アセトニトリル、または0.092%(v/v)TFA/60%(v/v)アセトニトリル)の濃度勾配で展開(流速 1ml/分または2.5ml/分)し、210nmの吸光度測定にてピーク面積を計測し行った。

15 DNA オリゴマーは、グライナーージャパン(株)またはライフテックオリエンタル(株)にて合成した。

PGI₂ 産生抑制活性は、SHR の腸管膜動脈から採取した平滑筋細胞、または、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)からの上清中へ分泌されるPGI₂ の安定代謝産物(6-ケート-PGF_{1α})を測定し、評価した。すなわち、SHR の腸管膜動脈から採取した平滑筋細胞は、10%(v/v)ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で継代培
20 養し、コンフルエントな状態に達するまで培養した。HUVEC は、2%(v/v)ウシ胎児血清、10ng/ml EGF、5ng/ml bFGF、1μg/ml ハイドロコルチゾン、10μg/ml ヘパリン含有合成培地(HuMedia クラボウ(株))で増殖させた。6-ケート-PGF_{1α}は、SHR の腸管膜動脈から採取した平滑筋細胞、または HUVEC を、測定試料を添加した
25 DMEM 培地中で30分間インキュベーションし、その間に上清へ分泌された量を測定した。

血圧は、75mg/kgケタミンと15mg/kgキシジラジン塩酸で麻酔したラットの大動脈に直接カテーテルを挿入し、観血的に測定した。すなわち、20U/ml ヘパリンを含む生理食塩水で満たした2本のポリエチレンカテーテルを左頸動脈と左大腿静脈に挿入し、

左頸動脈に挿入したカテーテルをポリグラフに連動した圧力検出器 (Carrier Amplifier AP-601G; 日本光電(株)) に接続した。サンプルは200 μ L の生理食塩水に溶解して大静脈から投与した。

- 各種機器、試薬等の使用方法は各々附属の使用説明書に従った。また、遺伝子操作
- 5 に関わる基本的操作は、マニアティスら "モレキュラークローニングアラボラトリーマニュアル" コールドスプリングハーバーラボラトリー1989年を参考にした。

[実施例1] キメラタンパク質発現法による CF6 の調製 - 1

- キメラタンパク質からの切り出し酵素として、エンテロキナーゼを用いる CF6 の製造方
- 10 法の具体例を以下に示す。

(rCF6 および hCF6 cDNA の調製)

- rCF6 cDNA は、ラット肝臓 cDNA (クイッククローン cDNA ライブラリー、クローンテック(株)) を鋳型とし、rCF6-01 (配列番号6) および rCF6-02 (配列番号7) をプライマーとする PCR 法により得た。すなわち、耐熱性 DNA ポリメラーゼに KOD (東洋紡(株)) を
- 15 用い、ラット肝臓 cDNA ライブラリー1 μ L、10x 反応バッファー5 μ L、2mM dNTP ミックス7.5 μ L、rCF6-01 0.5 μ L、rCF6-02 0.5 μ L、滅菌水 35 μ L からなる反応液を 96°C、30 秒; 56°C、1 分; 74°C、40 秒のサイクルを 30 回繰り返して rCF6 cDNA を得た。同様に hCF6 cDNA は、ヒト腎臓 cDNA (クイッククローン cDNA ライブラリー、クローンテック(株)) を鋳型とし、hCF6-01 (配列番号8) および hCF6-02 (配列番号9) をプライマ
- 20 ーとする PCR 法により得た。反応条件はラットの場合に準じて行った。

配列番号6 5'- ATGACTGTTTCAGAGGATCTTCAG -3'

配列番号7 5'- GTCGACTCAGGACTGGGGTTTGTCGAG -3'

配列番号8 5'- ATGATTCTTCAGAGGCTCTTCAG -3'

配列番号9 5'- GTCGACTCAGGCCTGGGGTTTTTCGATG -3'

- 25 得られた rCF6 cDNA および hCF6 cDNA は 1.5% (w/v) アガロース電気泳動の後、SUPREC-01 (宝酒造(株)) にて回収し、エンテロキナーゼにより rCF6 または hCF6 を切り出すことが可能なキメラタンパク質遺伝子を作成するための鋳型として用いた。

(エンテロキナーゼ認識配列を付加した rCF6 および hCF6 cDNA の調製)

エンテロキナーゼにより rCF6 および hCF6 を切り出し可能なキメラタンパク質遺伝子を

作成するために rCF6 または hCF6 の N 末端側をコードする遺伝子の 5'側に Asp-Asp-Asp-Lys をコードする遺伝子配列および制限酵素 Eco RI 認識配列を持つ DNA オリゴマーを合成した(rCF6E;配列番号10および hCF6E;配列番号11)。

配列番号10

- 5 5'- GAATTCGACGATGACGATAAGAATAAGGAACTTGATCCTGTACAG -3'

配列番号11

5'-GAATTCGACGATGACGATAAGAATAAGGAACTTGATCCTATACAGA -3'

- 配列番号10の DNA 配列は rCF6 cDNA を鋳型とし、rCF6E(配列番号10)および rCF6-02(配列番号7)をプライマーとする PCR 法により導入した。PCR の耐熱性 DNA ポリメラーゼには Taq DNA ポリメラーゼ(ファルマシア(株))を用いた。すなわち、rCF6cDNA 1 μ L、10x 反応バッファー5 μ L、1.25mM dNTP ミックス 8 μ L、rCF6-01 0.5 μ L、rCF6-02 0.5 μ L、滅菌水 25 μ L からなる反応液を 96°C、1 分;60°C、1 分;72°C、30 秒のサイクルを 8 回繰り返してエンテロキナーゼ認識配列および制限酵素 Eco RI 認識配列を 5'側に持つ rCF6 cDNA を得た。増幅した DNA 断片は、pCRII にクローニング(pCRrCF6EK)し、塩基配列を確認した。同様に配列番号11の DNA 配列は hCF6 cDNA を鋳型とし、hCF6E(配列番号11)および hCF6-02(配列番号9)をプライマーとする PCR 法により導入した。反応条件はラットの場合に準じて行った。増幅した DNA 断片は、pCRII にクローニング(pCRhCF6EK)し、塩基配列の確認した。(キメラタンパク質発現ベクターの構築)

- 20 プラスミドpCRrCF6EK およびpCRhCF6EK を制限酵素 Eco RI および Sal I で切断し、0.3kb からなる Eco RI-Sal I DNA断片rCF6EK およびhCF6EK を得た。これらのDNA断片は、エンテロキナーゼの認識配列 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys(配列番号3)が N 末端に付加したrCF6またはhCF6を含むタンパク質をコードするDNA塩基配列を有し、その上流に制限酵素 Eco RI、下流に制限酵素 Sal I 部位を有する。プラスミドpGP#19RI を制限酵素 Eco RI と Sal I で切断後、ベクター部分を含む約3.5kb DNA断片を調製した。これとDNA断片rCF6EK またはhCF6EK を連結し、それぞれプラスミドpG139SrCF6EK とpG139ShCF6EK 得た(図1)。

(キメラタンパク質発現と精製)

プラスミドpG139SrCF6EK またはpG139ShCF6EK を用いて大腸菌JM109株を形

質転換し、JM109[pG139SrCF6EK]およびJM109[pG139ShCF6EK]を得た。JM109[pG139SrCF6EK]およびJM109[pG139ShCF6EK]は、3 L ジャーファメンターを用い10 μ g/mLテトラサイクリンを含むSB培地で、37°Cで通気攪拌培養した。8時間後、最終濃度 1 mM になるように IPTG を添加しさらに一晩培養した。培養液3
5 Lは、6000rpm、4°Cにて10分間遠心(20PR-52D;日立製作所(株))し、菌体を回収した。菌体を、0.5 % (w/v) TritonX-100 を含む 20 mM トリス塩酸 (pH7.0)、1 mM EDTA に懸濁し、超音波により菌体を破碎後、6000rpmで、4°Cにて15分間遠心(05PR-22;日立製作所(株))し、インクルージョンボディーとしてキメラタンパク質を沈殿画分に回収した。沈殿画分の溶解、遠心の操作をさらに3回繰り返し、粗精製キメラタン
10 パク質を得た。hCF6 キメラタンパク質も同様に調整した。

(キメラタンパク質からのhCF6およびrCF6の切り出しと精製)

キメラタンパク質からrCF6を切り出す方法には、切り出し酵素としてファクターXa用いる方法がある(参考例2)。しかし該方法で、キメラタンパク質を可溶化してファクターXaを作用させるためには、2M以上の尿素が必要であり、この尿素濃度では、ファクターXa
15 の活性は1/10に低下する。このため、キメラタンパク質の1/60という大量のファクターXaが必要となる。また、尿素存在下のファクターXaの基質特異性は低く、キメラタンパク質からのrCF6の切り出し効率は約8%と低いものであった。

そこで、切り出し酵素としてエンテロキナーゼを用いることで、CF6の切り出し効率を改善した。まず、粗精製rCF6キメラタンパク質4mgを10 M尿素溶液 1.75mLに可溶化
20 した後、遠心にて不溶物を取り除いた。上清に10 x EKバッファー(200mMトリス塩酸(pH8.0)、500 mM NaCl、20 mM CaCl₂) 0.5mL、30U(約3.4 μ g、基質の約1200分の1量)のエンテロキナーゼ(ストラタジーン(株))を添加し、蒸留水で5mLとした。22°Cで一晩反応後、反応液をSepPak18(ウォーターズ(株))にかけてペプチドを吸着させた。吸着したペプチドは0.1% (v/v) TFAを含む80% (v/v)のアセトニトリ
25 ル溶液に溶出した。溶出液は凍結乾燥後、0.1% (v/v) TFAに溶解し、1/10量をYMC-ODS-A302(d4.6mmX150mm)を接続したHPLCに供し、サンプルロード後約14.2分に溶出されるピークをrCF6画分として分取した(図2)。同様の操作を10回繰り返して、この溶出画分をまとめ粗精製rCF6とした。

粗精製rCF6画分は、凍結乾燥後0.1% TFAに溶解し、YMC-ODS-AM-323を

接続した HPLC にて精製した(図3、%B:40-43/18分;流速2.5ml/分)。約14.2分に溶出するピークは、分取後凍結乾燥し、rCF6 標品とした。rCF6 の構造は、質量分析計 MALDI-TOFMS (VoyagerElite; 日本パーセプティブ(株))でシングルピークであり、分子量が理論値とほぼ一致すること、さらに、アミノ酸配列分析計(PPSQ-10; 島津製作所(株))を用いて N 末端10アミノ酸がrCF6 のそれと同一であることによって、確認した。

hCF6 のキメラタンパク質からの切り出しと精製は、rCF6 の場合と同様に行った。hCF6 は、最初の HPLC では約18.0分に溶出した(図4)。再クロマトの精製では約10.5分に溶出した(図5、溶出濃度勾配、%B:45-48/18分)。構造はrCF6 の場合と同様に確認した。

hCF6 およびrCF6 は、400mgのキメラタンパク質から、それぞれ、約 210 μ g および約 290 μ g 得られ、切り出し効率は、それぞれ約15%および約20%であり、切り出し酵素としてファクターXaを用いた場合(回収率8%)に比して、2~2.5 倍に改善した。

15 [実施例2] ラット血液中 CF6 の測定

(抗ラット CF6 ウサギ抗体(抗rCF6 抗体)の作製)

rCF6 (配列番号2)のC末端19アミノ酸のN端にシステインを付加した計20アミノ酸からなるペプチド(CFPTFNFE₂DPKFEVLDPQS:C-rCF6(58-76):配列番号12)を Fmoc 固層法により合成し、C-18 カラムを用いた HPLC にて精製した。合成ペプチドのN末端のシステインを介してキャリアータンパクであるキーホールリンペットヘモシアン(KLH)に結合させ、免疫用抗原を作製した。

動物はニュージーランドホワイト種雌ウサギ 2 羽を用いた。初回に完全フロイントアジュバント(CFA)で乳化させた抗原をウサギの背部皮下4ヶ所に投与後、その2週、6週、8週後に不完全フロイントアジュバント(IFA)で乳化させた抗原を同様に投与して免疫させた。動物の全血液を採血し、抗血清を得た。抗血清の抗体価を、抗原を固定化した ELISA にて測定した。免疫前のウサギの血清の抗体価が50以下で、免疫したウサギの血清の抗体価は、それぞれ59,600と81,400であった。抗体は、抗原ペプチド6mgを結合させたアガロースゲルアフィニティーカラム(6ml)に、抗血清を添加、洗浄後、低pH で溶出し、精製した(図6)。精製した抗体は濃縮後、0.1%(w/v)NaN₃ を含む

PBS 溶液に対して透析後、使用時まで -80°C で保管した。

(rCF6 濃度の測定方法の設定)

rCF6 (配列番号2)のC末端19アミノ酸のN端にチロシンを付加した計20アミノ酸からなるペプチド(YFPTFN FEDPKFEVLDPKQS:Y-rCF6(58-76):(配列番号13)

- 5 を Fmoc 固層法により合成し、C-18 カラムを用いた HPLC にて精製した。Y-rCF6(58-76)の放射性ヨウ素標識(^{125}I ラベル化)は、ラクトパーオキシダーゼ法により行い、 ^{125}I ラベル化 Y-rCF6(58-76)は C18 カラムを用いた HPLC にて精製後、最終濃度 0.1% (w/v) の牛血清アルブミンを添加し、使用時まで -80°C で保管した。

- 反応系としては、 ^{125}I ラベル化抗原と抗体との反応を、サンプル中の抗原により阻止
- 10 することによって定量する拮抗阻害系を用いた。すなわち、0.25~32ng の rCF6 を含むサンプル 100 μL と rCF6 抗体(2500倍希釈) 100 μL とを混ぜ12時間反応させた後、これに ^{125}I ラベル化 Y-rCF6(58-76) 100 μL (20,000cpm) を添加して、さらに1晩反応させた。これに 200 $\mu\text{g/mL}$ ウサギ IgG 100 μL および 10% (w/v) ポリエチレングリコール 6000 を含む RIA バッファー (50mM Na_2HPO_4 、80mM NaCl 、25mM
- 15 EDTA \cdot 2Na、0.05% (w/v) NaN_3 、0.5% (w/v) 牛血清アルブミン、pH7.4) で 60 倍希釈した抗ウサギ IgG ヤギ血清 (日本抗体研究所) 1mL を添加し、1 時間放置した。3,000rpm、30 分間遠心後、上清を除き、沈殿の ^{125}I をガンマカウンターにて測定した。すべての反応は 4°C で行った。その結果、0.25~16ng/100 μL の範囲で、沈殿に用量依存的な放射活性が観察された。従って、サンプル中の rCF6 濃度の測定方法を設定
- 20 することができた。

(ラット血液中rCF6の測定)

前述の測定方法を用い、4 週齢の雄性高血圧自然発症ラット (SHR) と正常血圧ラット (WKY)、並びに16週齢の SHR と WKY の血液中 rCF6 を測定した。

- 各群5匹のラットについて、1/10 用量の 1% (w/v) EDTA \cdot 2Na 溶液を含む注射筒
- 25 を用いて採血した。得られた血液を冷却遠心にかけて、血漿を抽出した。血漿は測定まで -80°C で保存した。その血漿 0.8ml に 2N 塩酸 0.2ml を添加後、 4°C で 10 分間放置した。次に、 4°C で 10,000rpm、30 分間遠心し、この上清を SepPakC18 カラムに添加、0.1% (v/v) TFA 5ml で 3 回洗浄した。カラムから、0.1% (v/v) TFA を含む 60% (v/v) アセトニトリル溶液 2ml に溶出後、真空下で溶媒を除去し、0.2~0.4ml の RIA

バッファーに溶解し、RIA 用サンプルとした。これを前述の抗rCF6 抗体を用いた上記の測定方法に供した。

各群のラットの血漿中rCF6を測定した結果、いずれの群においてもrCF6が血漿中に200pg/mL以上であった。また、4週齢ではSHRとWKYの血漿中rCF6濃度に差がないこと、16週齢ではSHRの血漿中rCF6濃度が有意に増加し、WKYのそれに比べ高かった($p < 0.05$) (表1)。

このようにラット血液中にはrCF6が存在することが初めて明らかになった。また、PGI₂が不足している自然発症高血圧モデル(SHR)において、加齢すなわち高血圧の発症とともに血中rCF6濃度が増加することが認められた。すなわち、PGI₂の不足に起因する高血圧の発症とCF6の血液中の濃度には相関があることが認められた。

[表1]

表1:血漿中rCF6濃度 (pg/ml)

	WKY	SHR
4 週齢	414±123	216±108
16週齢	294±126	2310±813

15

平均±標準誤差

(HPLCによるRIA用サンプル中の抗rCF6抗体反応性画分の分子)

抗rCF6抗体は、rCF6の58番目から76番目までの断片を抗原として調製した。このため、上記RIA系で評価したCF6量には、rCF6由来C末断片を含むペプチドの量も含まれる。RIAサンプルをHPLCにて分画し、各画分の抗rCF6抗体反応性を調べた。

20 RIA用サンプルをSepPak18に吸着させ、0.1%(v/v)TFAを含む60%(v/v)アセトニトリル溶液で溶出した。溶出したサンプルは、凍結乾燥後、0.1%(v/v)TFAに溶解し、InertsilODS-2 C18(d4.6mmX250mm)カラム(GLサイエンス(株))を接続したHPLCにて分離、分画した(0.1%(v/v)TFAを含む20%(v/v)アセトニトリル溶液で5分以上洗浄後、20-60%アセトニトリル直線勾配/30分で溶出)。抗rCF6

25 抗体を用いた上記測定系での抗体反応性の90%以上がrCF6と同じ画分に溶出することが確認された。

すなわち、血液中に存在する抗rCF6抗体反応性分子の90%以上は、rCF6由来C末断片を含むペプチドではなく、rCF6であることが示唆された。

〔実施例3〕 抗hCF6ウサギ抗体(抗hCF6抗体)の作製とhCF6測定系の構築

免疫用抗原に、hCF6 (配列番号1)の N 末端10～27アミノ酸のN端にシステインを付加した計19アミノ酸からなるペプチド(CLFVDKIREYKSKRQTSGG:C-hCF6(10-27);配列番号14)とKLHとの結合物を用い、【実施例2】と同様にして、hCF6 に対する抗血清を得た。免疫したウサギの血清の抗体価は、それぞれ 123, 000と121, 300であった。抗hCF6 抗体は【実施例2】と同様に精製した。hCF6 の測定系は、¹²⁵I ラベル化ペプチドにhCF6 (配列番号2)の N 末端10～27アミノ酸からなるペプチド(LFVDKIREYKSKRQTSGG:hCF6(10-27);配列番号15)を、標準品としてhCF6を用いた以外は、rCF6測定系と同様にして作製した。

10

〔実施例4〕 抗rCF6抗体のラット血圧に与える影響

(抗rCF6抗体のラット血圧に与える影響)

16週齢の SHR と WKY を麻酔後、大腿静脈から抗rCF6 抗体(0.3、1.0、3.0 μ g/kg)をボラス投与し、動脈圧を頸動脈より観血的に測定した。その結果、SHR では、抗rCF6 抗体投与により平均動脈圧が低下し、その低下度は用量依存的であった(図7および図8)。一方、WKY では抗rCF6 抗体投与により有意な血圧変動は示さなかった(図8)。また、非特異的ウサギ抗体(IgG:10 μ g/kg)の投与は、SHR と WKY の動脈圧に影響を与えなかった。

(抗rCF6抗体前投与がブラジキニンのラット血圧低下に与える影響)

20 ブラジキニンのラット血圧低下作用に与える抗rCF6 抗体の影響を調べた。16週齢の SHR と同週齢の WKY を麻酔後、ブラジキニン(0.3、1.0、3.0 μ g/kg)を大腿静脈から累積的にボラス投与し、動脈圧を頸動脈より観血的に測定した。次に、抗rCF6 抗体(3.0 μ g/kg)を大腿静脈からボラス投与後、同様にブラジキニンを投与し、血圧反応を観察した。

25 その結果、ブラジキニン投与は SHR と WKY で、用量依存的に血圧を低下させた(図9-1および図10)。また、SHR では、抗rCF6 抗体投与によりブラジキニン投与による血圧低下を増強させたが(図9-2および図10)、WKY では影響を与えなかった(図10)。

このように、抗rCF6 抗体は、rCF6 濃度が上昇している高血圧の状態においてのみ、

降圧作用を示し、CF6 の阻害が、血液中の CF6 の過剰に起因する疾患の症状の改善に有効であることが示された。

[実施例5] rCF6投与がラット血圧に与える影響

- 5 rCF6 がラットの血圧に与える影響を調べた。15週齢の SHR または WKY を麻酔後、大腿静脈からrCF6 (0.3、1.0、3.0 μ g/kg) をボラス投与し、動脈圧を頸動脈より観血的に測定した。SHR および WKY において、rCF6 投与により用量依存的に平均動脈圧が上昇したが、その作用は WKY より SHR においてより顕著であった(図11、図22)。
- 10 血中 CF6 濃度が高い SHR において、CF6 の効果が顕著に見られたことは、SHR が CF6 の作用に対してより感受性が強い状態であることを示唆している。

実施例4での抗rCF6 抗体による SHR 血圧の降下作用の結果と合わせると、CF6 アゴニストおよび CF6分泌阻害薬は、血液中の CF6 が過剰な状態の疾患にである高血圧において根治的な治療薬になり得る。すなわち、血中 CF6 濃度の制御は、血中 CF6

- 15 濃度の異常な疾患の治療方法として有効であることが示唆された。

[実施例6] 正常人および急性心筋梗塞患者の血漿中hCF6

- 健常人(6名)および急性心筋梗塞患者(18名)から、1/10用量の1%(w/v) EDTA・2Na 溶液を含む注射筒を用いて静脈より採血した。急性心筋梗塞患者はすべて冠動脈形成術(PTCA)の成功例であり、採血は、発症日、2、3、5、7、14日に行った。得られた血液を冷却遠心にかけ、血漿を抽出した。血漿は測定まで -80°C で保存した。
- 20

- hCF6 測定用サンプルは血漿から以下の方法で調製した。すなわち、血漿0.8mlに2N 塩酸0.2mlを添加後、 4°C で10分間放置した。次に、 4°C で10,000rpm、30分間遠心し、この上清を SepPakC18 カラムに添加、0.1%(v/v) TFA 5mlで3回洗浄した。カラムから、0.1%(v/v) TFAを含む60%(v/v) アセトニトリル溶液2mlに溶出後、真空下で溶媒を除去し、0.2~0.4mlの RIA バッファーに溶解し、RIA 用サンプルとした。
- 25

hCF6 濃度は、組換えhCF6を標準とし、抗hCF6抗体を用いて[実施例3]のrCF6測

定方法と同様の方法で行った。

健常人の血漿中には、 $15.2 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$ (平均 \pm 標準誤差)の濃度のCF6が検出され、ミトコンドリア内膜のタンパク質であるCF6が、ラットのみならずヒトにおいても血液中に存在することが確認できた(図 23)。また、急性心筋梗塞患者の血漿中 CF6 濃度のピーク

- 5 は発症日または2日目で、その血漿中CF6濃度は $22.1 \pm 1.3 \text{ ng/ml}$ と高値を示した(図 23)。発症日および2日目の血漿中CF6濃度は、それぞれ $20.2 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$ と $17.7 \pm 1.5 \text{ ng/ml}$ で、14日目の $13.7 \pm 0.7 \text{ ng/ml}$ に比べ、有意に高値を示した(図 24; Fisher の PLSD : $p < 0.001$ および $p = 0.01$)。7日目および14日目の血漿中CF6濃度は、それぞれ、 $13.7 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$ と $13.7 \pm 0.7 \text{ ng/ml}$ で、健常人のレベルまで低下した。
- 10 急性心筋梗患者では血中CF6濃度が上昇することが示されたことから、急性心筋梗などのCF6濃度の変化を伴う疾患において、CF6濃度の測定が診断方法として有用であることが示された。

[実施例7] HUVEC 培養上清液中へのCF6放出

- 15 コンフルエントな状態のHUVECを、ウシ胎児血清を含まない199培地で培養(直径10cm、ペトリ皿)し、24時間、48時間、72時間後に培養上清をサンプリング(各点 $n = 4$)し、hCF6量を測定した。実施例6記載の方法で、培養上清を処理し、hCF6濃度を測定した。経時的に培養上清中のCF6濃度が増加し、HUVECからhCF6が放出されることが明らかになった(図25)。
- 20 従って、候補物質を本試験のHUVEC培養液中に添加し、培養液中に分泌されるCF6量をコントロールと比較する方法を用いることにより、CF6分泌促進物質やCF6分泌抑制物質を得ることができる。

[参考例1] プロスタサイクリン産生抑制因子の同定

- 25 プロスタサイクリン産生抑制因子は以下に示す方法によってCF6と同定した。
- 187匹のSHR(16~20週齢)の心臓(152g、沸騰水中に10分間放置)から、1N酢酸を抽出液としてペプチドを抽出した。抽出物は、Sephadex G-25(1.5x30cm)に供し、0.5mlずつ分画した(流速3ml/分;図12)。活性画分(19-21)は、Inertsil ODS-2 C18(4.6mm X 250mm)カラム(GLサイエンス(株))を接続したHPLCにて分離、

精製した(0.1%(v/v)TFAを含む20%(v/v)アセトニトリル溶液で5分以上洗浄後、20-60%アセトニトリル直線勾配/30分で溶出、流速1ml/分;図13)。活性は、SHRの腸管膜動脈から採取した平滑筋細胞からの上清中へ分泌される6-ケート-PGF 1 α を測定し、評価した。精製したペプチド(図14)は、アミノ酸配列分析計(PPSQ-10;島津製作所(株))を用いて、N末端から39アミノ酸(NKELDPVQKLFLDKIREYKA KRLASGGPVDTGPEYQQEV;配列番号2の1~39アミノ酸;配列番号16)を、また AsnN 分解後の断片をYMC-ODS-A302(d4.6mmX150mm)を接続したHPLCにて精製し、DRELFLKLKQMYGKGEM(;配列番号2の40~55アミノ酸;配列番号17)、DKFPTFNFE(;配列番号2の56~64アミノ酸;配列番号18)、DPKFEVL(;配列番号2の65~71アミノ酸;配列番号19)、DKPQS(;配列番号2の72~76アミノ酸;配列番号20)の配列を決定した。これらの配列は、ラットプロトン輸送性 ATP 合成酵素のサブユニットであるrCF6(配列番号2)と完全に一致した。

15 [参考例2] キメラタンパク質発現法による CF6 の調製-2

キメラタンパク質からの切り出し酵素としてファクターXaを用いる、rCF6(配列番号2)の製造方法を以下に示す。

(rCF6 DNA の調製)

N末端にファクターXa認識配列である Ile Glu Gly Lys 配列(配列番号21)を付加したrCF6タンパク質をコードする遺伝子を含む DNA 断片をPCRで得た。鋳型として、100°Cで1分間処理したラット大動脈cDNAライブラリー(クロンテック(株))を使用し、プライマーとしてCF03(配列番号22)およびCF04(配列番号23)を用いた。

DNA断片はpCRIIにクローニング(pCRIIrCF6Xa)後、DNA塩基配列を決定し、その構造を確認した。

25 配列番号22 5'-GATCGAGGGACGTAATAAGGAACTTGATCCT-3'

配列番号23 5'-GTCGACTTAGGACTGGGGTTTGTCTGA-3'

(発現ベクターの構築)

プラスミドpCRIIrCF6Xaを制限酵素EcoRIおよびSalIで切断し、0.3kbからなるEcoRI-SalIDNA断片を得た。このDNA断片は、プラスミドpCRII DNA由来のGlu-

Phe-Gly-Leu 配列の C 末端にファクター Xa の認識配列 Ile-Glu-Gly-Lys が結合した Glu-Phe-Gly-Leu-Ile-Glu-Gly-Lys 配列(配列番号24)が rCF6 の N 末端に付加したタンパク質をコードする DNA 塩基配列を有し、その上流に制限酵素 Eco RI、下流に制限酵素 Sal I 部位を有する。プラスミド pG97S4DhCT[G] を制限酵素 Eco RI と Sal I

5 で切断後、ベクター部分を含む約 3.5 kb DNA 断片を調製した。これと 0.3 kb からなる Eco RI-Sal I DNA 断片を連結し、プラスミド pG97SDrCF6Xa を得た(図15)。

(rCF6 キメラタンパク質発現と精製)

プラスミド pG97SDrCF6Xa を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、JM109[pG97SDrCF6Xa] を得た。JM109[pG97SDrCF6Xa] を、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ テトラサイクリンを含

10 む LB 培地に接種し、 37°C で 6 時間培養した。最終濁度 ($\text{OD}_{660\text{nm}}$) が 0.1 になるよう培養液を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ テトラサイクリンと 5 mM IPTG を含む SB 培地に接種し、 37°C で 16 時間培養した。

培養液を 6000 rpm、 4°C にて 10 分間遠心 (20PR-52D、日立製作所(株)) し、菌体を回収した。菌体を、1 mM EDTA・Na を含む 20 mM トリス塩酸 (pH 8.0) に懸濁し、フレ

15 ンチプレスにて破碎した (10,000 psi; 2 回)。

菌体破碎液を 8,000 rpm、 4°C にて 20 分間遠心 (05PR-22、日立製作所(株)) した。沈殿を 0.5% (w/w) Triton X-100 を含む 20 mM トリス塩酸 (pH 8.0) 30 ml に懸濁後、3,000 rpm、 4°C にて 15 分間遠心し、沈殿を回収した。この操作を 4 回繰り返し、粗精製キメラタンパク質とした。

20 (キメラタンパク質からの rCF6 の切り出しと精製)

キメラタンパク質からの切り出しは、 $3\text{mg}/\text{mL}$ 粗精製キメラタンパク質濃度で $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ファクター Xa (宝酒造(株)) を用い、2 M 尿素を含む 50 mM トリス塩酸 (pH 8.0)、100 mM NaCl、1 mM CaCl_2 溶液中で、 37°C 4 時間反応させた。反応液は SepPak C18 カラムに吸着後、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸で洗浄し、0.1% (v/v) トリフルオロ酢

25 酸を含む 80% (v/v) アセトニトリル溶液にペプチドを回収した。溶出液は凍結乾燥後、0.1% (v/v) TFA に溶解し、rCF6 は YMC-ODS-A302 を接続した HPLC にて精製した (%B: 35-50/30 分; 14.5 分に溶出)。rCF6 の構造は実施例 1 と同様にして確認した。

ただし、本方法におけるキメラタンパク質からの rCF6 の切り出し効率は約 8% と低く、

大量の CF6 が必要となるイン・ビボの試験などを実施するためには、さらに効率的な CF6 の製造方法が必要であると思われた。

[参考例3] CF6のプロスタサイクリン産生抑制

- 5 参考例2で調製した、1、10、100nM のrCF6を含む DMEM で HUVEC を 37℃、30 分培養し、CF6によるPGI₂ 産生抑制を調べた。PGI₂ 産生は培地中に分泌されるPGI₂ の安定代謝物である6-ケト-PGF1 α 量を指標とした。その結果、CF6は用量依存的にPGI₂ 産生を抑制した(図16)。1 μ M のブラジキニン存在下でも同様の試験を行い、CF6はブラジキニンによるPGI₂ 産生上昇を用量依存的に抑制することがわかった(図1
10 7)。

さらに、10nMのCF6は、2 μ g/ml イオノマイシンによるPGI₂産生上昇を抑制したが、細胞外から添加した10ng/ml アラキドン酸および10ng/ml PGH₂ によるPGI₂ 産生上昇を抑制しなかった。

- PGI₂ は、リン脂質を出発物質として産生される。すなわち、リン脂質から PLA₂により切り出されたアラキドン酸が、シクロオキシゲナーゼによりPGH₂に変換され、さらにPGI₂合成酵素により変換される。イオノマイシンは、この反応中の PLA₂の活性化、すなわち、リン脂質からのアラキドン酸が切り出しを促進する。
15

- よって、CF6 の作用が、アラキドン酸や、アラキドン酸カスケードの下流の産物である PGH₂ からのPGI₂ 産生を抑制しないこと、および、PLA₂ の活性化に基づくPGI₂ 産生を抑制することから、CF6 のPGI₂ 産生抑制作用は、PLA₂ 作用の阻害であることが示された。
20

[参考例4] CF6のアラキドン酸の遊離抑制作用

- 参考例3から、CF6 のPGI₂ 産生抑制作用が、PLA₂ 作用の阻害に基づくことが示された。一方、脂肪酸からアラキドン酸を遊離する PLA₂ は、構造および生化学的な性質から大きく、Ca²⁺依存性細胞質型 PLA₂(cPLA₂)、Ca²⁺依存性分泌型 PLA₂(sPLA₂)、Ca²⁺非依存型 PLA₂(iPLA₂)に 3 つに分けられる。それぞれの阻害剤を用いて、CF6 がどの PLA₂を阻害しているかを検討した。
25

HUVEC を [³H] 標識アラキドン酸存在下で24時間培養後、培地を DMEM に変え、

さらに1、10、100nMのCF6存在下で37°C、30分培養し、培養液中での $[^3\text{H}]$ 標識アラキドン酸の遊離を調べた。その結果、CF6は用量依存的に $[^3\text{H}]$ 標識アラキドン酸の遊離を抑制した(図18)。さらに同様の試験を1 μM のブラジキニン存在下で行い、CF6はブラジキニンによる $[^3\text{H}]$ 標識アラキドン酸の遊離促進作用を用量依存的に抑制すること

5 がわかった(図19)。

次に、1 μM のブラジキニン存在下または非存在下における、cPLA₂阻害剤(40 μM AACOCF₃;アラキドン酸3フルオロメチルケトン)、sPLA₂阻害剤(1 μM OPC;オレイルオキシエチルホスホリルコリン)、または iPLA₂阻害剤(1 μM BEL;プロモエノールコリン)による HUVEC からのアラキドン酸遊離の抑制作用を調べた。その結果、HUVEC

10 においては、cPLA₂阻害剤のみがアラキドン酸遊離を抑制すること、すなわち、HUVEC からのアラキドン酸遊離に関わる PLA₂はcPLA₂であることがわかった(図20、21)。

cPLA₂は、アラキドン酸含有リン脂質に高い特異性を示し、 μM オーダーのCa²⁺濃度で選択的にアラキドン酸を遊離する。cPLA₂過剰発現マウスやcPLA₂欠損マウスを用い

15 た実験から、cPLA₂は即時相のアラキドン酸の代謝のみならず、炎症反応で重要なアラキドン酸の遅延相においても重要なことが明らかになり、cPLA₂の阻害は強い炎症反応を示すことが期待されている(Uozumi N., et. al 390 618-622、1997)。

[産業上の利用の可能性]

本発明により、CF6 特異的な抗体が提供され、本因子が関与する病態の診断方法が

20 提供される。また、本発明により、血液中CF6の活性阻害に基づく正常血圧を低下させない高血圧等の疾患の治療方法が提供される。さらに、本発明に基づく診断方法により、血液中のCF6が増加または減少した病態の治療方法も提供される。

請求の範囲

1. カップリングファクター6(CF6)阻害剤を有効成分とする血液中の CF6 が過剰な疾患の予防薬または治療薬。
- 5 2. CF6 阻害剤が CF6 分泌抑制物質または CF6 アンタゴニストである請求項1に記載の予防または治療剤。
3. 血液中の CF6 が過剰な疾患が、心筋梗塞、狭心症、心不全、肺高血圧、高血圧症、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、動脈硬化、高脂血症、糖尿病、気管支疾患、胃潰瘍、妊娠子癇、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病である、請求項1
- 10 または請求項2に記載の予防薬または治療薬。
4. CF6 賦活剤または CF6 を有効成分とする血液中の CF6 が不足している疾患の予防薬または治療薬。
5. CF6 賦活剤が CF6 分泌促進物質または CF6 アゴニストである請求項4に記載の予防または治療剤。
- 15 6. 血液中の CF6 が不足している疾患が脳梗塞、急性膵炎、喘息、ARDS、慢性関節リウマチを含む炎症性疾患である、請求項4または請求項5に記載の予防薬または治療薬。
7. CF6 阻害剤を有効成分とする PGI_2 の不足した疾患および／または Ca^{2+} 依存性細胞質型 PLA_2 (cPLA_2)の作用の減弱した疾患の予防薬または治療薬。
- 20 8. CF6 阻害剤が CF6 分泌抑制物質または CF6 アンタゴニストである請求項7に記載の予防または治療剤。
9. PGI_2 の不足した疾患および／または cPLA_2 の作用の減弱した疾患が、心筋梗塞、狭心症、心不全、肺高血圧、高血圧症、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、動脈硬化、高脂血症、糖尿病、気管支疾患、胃潰瘍、妊娠子癇、溶血性尿毒症症候群、血栓性血
- 25 小板減少性紫斑病である、請求項7または請求項8に記載の予防薬または治療薬。
10. CF6 賦活剤または CF6 を有効成分とする、 PGI_2 が過剰である疾患および／または cPLA_2 の作用の亢進した疾患の予防薬または治療薬。
11. CF6 賦活剤が CF6 分泌促進物質または CF6 アゴニストである請求項 10 に記載の予防または治療剤。

12. PGI_2 が過剰である疾患および／または cPLA_2 の作用の亢進した疾患が、脳梗塞、急性膵炎、喘息、ARDS、慢性関節リウマチを含む炎症性疾患である、請求項 10 または請求項 11 に記載の予防薬または治療薬。

5 13. 採取した血液サンプル中の CF6 濃度を測定することを特徴とする、血液中の CF6 濃度が増加または減少している疾患の診断方法。

14. 採取した血液サンプル中の CF6 濃度を測定することを特徴とする、血液中の CF6 濃度が増加または減少している疾患の診断方法に用いる抗CF6抗体からなる診断助剤。

10 15. 抗CF6抗体が、ヒトCF6(配列番号1)またはラットCF6(配列番号2)の全部または一部を抗原として作製されたものである請求項 14 に記載の診断助剤。

16. CF6またはその部分ポリペプチドの遺伝子組換え技術による製造方法であって、該CF6またはその部分ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列が N末端にエンテロキナーゼ認識部位をコードするポリヌクレオチド配列を介して保護ペプチドと結合したキメラタンパク質をコードするDNAを含むベクターで形質転換された宿主を培養し、得られたキメラタンパク質をエンテロキナーゼで処理してCF6またはその部分ポリペプチドを製造する方法。

15

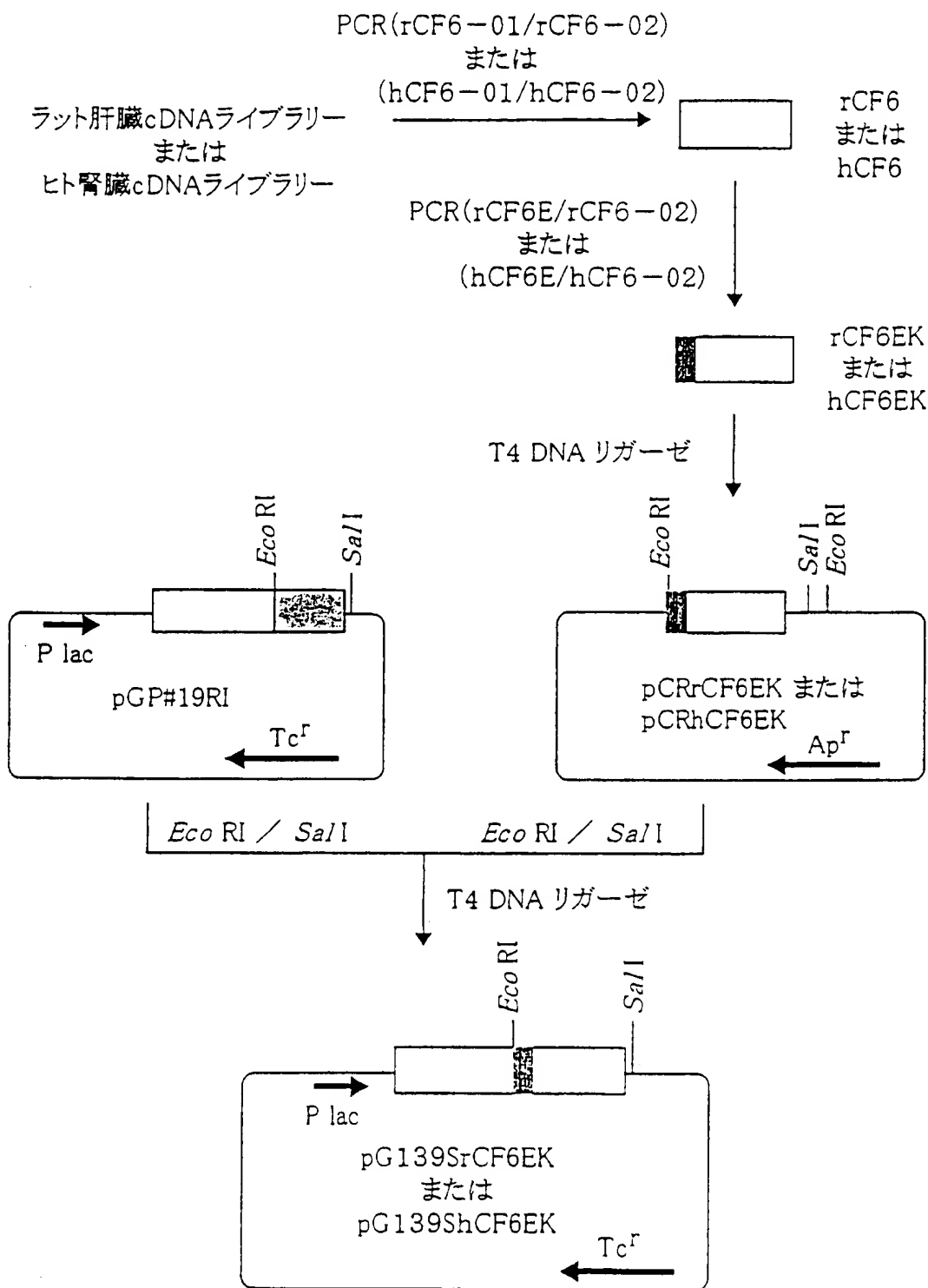
17. 血液中 CF6 濃度が増加または減少している疾患への罹病し易さの診断方法であって、該患者のゲノム中の CF6 遺伝子領域における遺伝子配列の変異の有無を決定することを含む方法。

20 18. 血液中 CF6 濃度が増加または減少している疾患が、 PGI_2 の不足または過剰と関連する疾患である請求項 17 に記載の方法。

19. 血液中 CF6 濃度が増加または減少している疾患が、 cPLA_2 作用の亢進または減弱と関連する疾患である請求項 17 に記載の方法。

25 20. CF6 濃度が増加または減少している疾患が急性心筋梗塞である請求項 13 の診断方法。

図1



III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	MAGOTA, Koji
III-2-5	Address:	2-14-38, Okutenjin-cho, Takatsuki-shi, Osaka 569-1118 Japan
III-2-6	State of nationality	JP
III-2-7	State of residence	JP
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio
IV-1-2	Address:	YUASA AND HARA Section 206, New Ohtemachi Bldg, 2-1, Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004 Japan
IV-1-3	Telephone No.	03-3270-6641
IV-1-4	Facsimile No.	03-3246-0233
IV-1-5	e-mail	yulawpat@yuasa-hara.co.jp
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	IMAI, Shosuke; MASUI, Chuji; KOBAYASHI, Yasushi; TOMITA, Hiroyuki; KURITA, Tadahiko
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AU CA CN HU JP KR US

V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	17 September 1999 (17.09.1999)	
VI-1-2	Number	264687/1999	
VI-1-3	Country	JP	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	Japanese Patent Office (JPO) (ISA/JP)	
VIII	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request	4	-
VIII-2	Description (excluding sequence listing part)	26	-
VIII-3	Claims	2	-
VIII-4	Abstract	1	-
VIII-5	Drawings	25	-
VIII-6	Sequence listing part of description	9	-
VIII-7	TOTAL	67	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	✓	-
VIII-15	Nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form		separate diskette
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	diskette
VIII-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
VIII-19	Language of filing of the international application	Japanese	
IX-1	Signature of applicant or agent		
IX-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio	(seal)
IX-2	Signature of applicant or agent		
IX-2-1	Name (LAST, First)	IMAI, Shosuke	(seal)

PCT REQUEST

YCT-515

IX-3	Signature of applicant or agent	
IX-3-1	Name (LAST, First)	MASUI, Chuji (seal)
IX-4	Signature of applicant or agent	
IX-4-1	Name (LAST, First)	KOBAYASHI, Yasushi (seal)
IX-5	Signature of applicant or agent	
IX-5-1	Name (LAST, First)	TOMITA, Hiroyuki (seal)
IX-6	Signature of applicant or agent	
IX-6-1	Name (LAST, First)	KURITA, Tadahiko (seal)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/JP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHAMOTO, Ichio
Yuasa And Hara
Section 206, New Ohtemachi Bldg.
2-1, Ohtemachi 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004
JAPON

y/b

Date of mailing (day/month/year) 29 March 2001 (29.03.01)		
Applicant's or agent's file reference YCT-515		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/05210	International filing date (day/month/year) 03 August 2000 (03.08.00)	Priority date (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)
Applicant SUNTORY LIMITED et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA, CN, EP, HU, JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 29 March 2001 (29.03.01) under No. WO 01/21205

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU


To:

SHAMOTO, Ichio
Yuasa And Hara
Section 206, New Ohtemachi Bldg.
2-1, Ohtemachi 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 06 November 2000 (06.11.00)	
Applicant's or agent's file reference YCT-515	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/05210	International filing date (day/month/year) 03 August 2000 (03.08.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)
Applicant SUNTORY LIMITED et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An **asterisk(*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
17 Sept 1999 (17.09.99)	11/264687	JP	21 Sept 2000 (21.09.00)

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Magda BOUACHA </p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

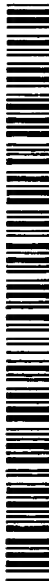


(43) 国際公開日
2001年3月29日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/21205 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 45/00, 38/17, A61P 9/04, 9/12, 9/10, 3/06, 3/10, 11/00, 1/04, 7/00, 9/10, C12N 15/12, G01N 33/53 岩木町大字駒越字村元31番1号 Aomori (JP). 孫田浩二 (MAGOTA, Koji) [JP/JP]; 〒569-1118 大阪府高槻市奥天神町2-14-38 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05210 (74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2000年8月3日 (03.08.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, HU, JP, KR, US.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) 優先権データ: 特願平11/264687 1999年9月17日 (17.09.1999) JP 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka (JP). 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長内智宏 (OS-ANAI, Tomohiro) [JP/JP]; 〒036-1322 青森県中津軽郡



WO 01/21205 A1

(54) Title: COUPLING FACTOR 6 INHIBITOR AND POTENTIATOR AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: カップリングファクター6阻害剤および賦活剤ならびにその用途

(57) Abstract: Methods of determining the presence/absence of coupling factor 6 (CF6), which is a subunit of a proton-translocating ATPase occurring in mitochondria, in blood and measuring the concentration of the factor in blood by using a CF6 antibody, etc.; and techniques of treating various diseases by clarifying the relationships of the changes in the concentration of the factor in blood, production of prostacyclin in association with these changes, cPLA₂ activity, etc. with the diseases to thereby inhibit or potentiate the factor and diagnosing various diseases based on these findings. A process of efficiently producing CF6 or its fragment by using a vector containing a DNA encoding CF6 or its fragment.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明は、ミトコンドリアに存在するプロトン輸送性ATP合成酵素のサブユニットであるカップリングファクター6 (CF6)の血液中での存在の有無、及び、CF6抗体等を用いた当該ファクターの血中濃度の測定方法を提供する。また、当該ファクターの血中濃度の変化、当該変化に伴うプロスタサイクリン産生、cPLA₂活性等と各種疾患との関係を明らかにし、当該ファクターを抑制又は賦活することによって当該各種疾患を治療し、また、当該知見に基づいて各種疾患を診断する技術を提供する。

さらに、CF6又はその断片をコードするDNAを含むベクターを用いてCF6又はその断片を効率的に製造する方法も提供する。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/17,
A61P9/04, 9/12, 9/10, 3/06, 3/10, 11/00, 1/04, 7/00, 9/10,
C12N15/12, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/17, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN) , BIOSIS (STN) , EMBASE (STN) , MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	OSANAI T. et.al. "Anovel inhibitory effect on prostacyclin synthesis of coupling factor 6 extracted from the heart of spontaneously hypertensive rats.", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol.273, No.48(1998), PP.31778-31783 whole document, especially DISCUSSION and ABSTRACT	1-12 14, 15
X Y	US, 5849527, A (Incyte Pharmaceuticals, Inc.), 15 December, 1998 (15.12.98), (No Family)whole document, especially column 16, lines 54-64 and sequences	1-3 14-16
Y	ANDO J. et. al., "Differential display and cloning of shear stress-responsive messenger RNAs in human endothelial cells.", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol.225, No.2 (1996), PP.347-351, whole document, especially ABSTRACT and from P.348 line 50 to P.349 line 2	14, 15
Y	EVANS A. et. al., "An import-competent precursor of small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 October, 2000 (11.10.00)

Date of mailing of the international search report
24 October, 2000 (24.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05210

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	generated by factor Xa cleavage from a .beta.-galactosidase fusion expressed in Escherichia coli.", Protein Expression Purif., Vol.3, No.3 (1992) P. 178-84, whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05210

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13,17-20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13 and 17 to 20 pertain to diagnostic methods practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☒ Claims Nos.: 1-12
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
In these claims, "a CF6 inhibitor, a CF6 potentiator, a CF6 agonist, a CF6 antagonist and a CF6-secretion promoter" are described as the active ingredient. However, those skilled in the art could not understand these substances except those particularly disclosed in the description, considering the common general technical knowledge at the filing date of the present application. Therefore, no meaningful international search can be practiced.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 15 and 17 to 20 pertain to remedies and diagnostics containing as the active ingredient a CF6 antibody, a CF6 agonist, etc. In contrast, the invention as set forth in claim 16 pertains to a process of producing CF6 or its peptide fragment. These two groups of inventions have nothing in common but CF6 and/or substances concerning thereto.

As the applicant has admitted in the description, the CF6 peptide had been publicly known and, therefore, cannot be regarded as a technical feature of the present application.

Such being the case, it is recognized the present application involves two or more inventions.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/17,
A61P9/04, 9/12, 9/10, 3/06, 3/10, 11/00, 1/04, 7/00, 9/10,
C12N15/12, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/17, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	OSANAI T. et.al. "A novel inhibitory effect on prostacyclin synthesis of coupling factor 6 extracted from the heart of s pontaneously hypertensive rats.", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEM ISTRY, Vol. 273, No. 48(1998) P. 31778-31783 whole document, es pecially DISCUSSION and ABSTRACT	1-12 14, 15
X Y	US, 5849527, A (Incyte Pharmaceuticals, Inc.) 15. 12月. 1998 (15. 1 2. 98) (No Family) whole document, especially column 16, lines 54-64 and sequences	1-3 14-16

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

*** 引用文献のカテゴリー**

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 10. 00

国際調査報告の発送日

24.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

印

4C

9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ANDO J. et. al., "Differential display and cloning of shear stress-responsive messenger RNAs in human endothelial cells.", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 225, No.2(1996)P.347-351, whole document, especially ABSTRACT and from P.348 line 50 to P.349 line 2	14, 15
Y	EVANS A. et. al. "An import-competent precursor of small sub unit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase generated by factor Xa cleavage from a .beta.-galactosidase fusion expressed in Escherichia coli.", Protein Expression Purif., Vol.3, No.3(1992)P. 178-84, whole document	16

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[PCT 18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 書類記号 YCT-515	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05210	国際出願日 (日.月.年) 03.08.00	優先日 (日.月.年) 17.09.99
出願人(氏名又は名称) サントリー株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。

☒ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13、17-20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲13、17-20は、人体の診断方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iV)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☒ 請求の範囲 1-12 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

これらの請求の範囲には「CF6阻害剤、CF6賦活剤、CF67ゴニストCF67ンタゴニスト、CF6分泌促進物質」が有効成分として記載されているが、それらの物質については、出願時の技術常識を勘案しても、明細書に具体的に開示されているもの以外については、当業者に把握することができないため、有意義な国際調査を行うことができない。

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1~15、17~20に記載の発明は、CF6抗体、CF67ゴニスト等を有効成分とする治療剤、診断剤であるのに対し、請求の範囲16に記載の発明は、CF6又はその部分ポリペプチドの製造方法であり、両者の共通点は、CF6及び/又はその関連物質のみと認められる。しかしながら、CF6ペプチドは、出願人が本願明細書中において認めるとおり公知の物質であるから、当該点をこの出願の技術的特徴点として認めることはできない。したがって、この出願には、二以上の発明があるものと認める。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅲ欄 要約 (第1ページの5の続き)

本発明は、ミトコンドリアに存在するプロトン輸送性ATP合成酵素のサブユニットであるカップリングファクター6 (CF6)の血液中での存在の有無、及び、CF6抗体等を用いた当該ファクターの血中濃度の測定方法を提供する。また、当該ファクターの血中濃度の変化、当該変化に伴うプロスタサイクリン産生、cPLA₂活性等と各種疾患との関係を明らかにし、当該ファクターを抑制又は賦活することによって当該各種疾患を治療し、また、当該知見に基づいて各種疾患を診断する技術を提供する。

さらに、CF6又はその断片をコードするDNAを含むベクターを用いてCF6又はその断片を効率的に製造する方法も提供する。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/17, —
A61P9/04, 9/12, 9/10, 3/06, 3/10, 11/00, 1/04, 7/00, 9/10,
C12N15/12, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/17, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	OSANAI T. et.al. "A novel inhibitory effect on prostacyclin synthesis of coupling factor 6 extracted from the heart of spontaneously hypertensive rats.", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol.273, No.48(1998) P.31778-31783 whole document, especially DISCUSSION and ABSTRACT	1-12 14, 15
X Y	US, 5849527, A (Incyte Pharmaceuticals, Inc.) 15.12月.1998(15.12.98) (No Family) whole document, especially column 16, lines 54-64 and sequences	1-3 14-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.10.00

国際調査報告の発送日

24.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

印

4C

9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ANDO J. et. al., "Differential display and cloning of shear stress-responsive messenger RNAs in human endothelial cells.", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 225, No.2(1996)P.347-351, whole document, especially ABSTRACT and from P.348 line 50 to P.349 line 2	14, 15
Y	EVANS A. et. al. "An import-competent precursor of small sub unit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase generated by factor Xa cleavage from a .beta.-galactosidase fusion expressed in Escherichia coli.", Protein Expression Purif., Vol.3, No.3(1992)P. 178-84, whole document	16

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

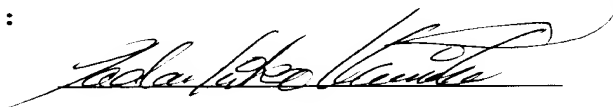
That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified application was filed, and that I believe the English translation of International Application No. PCT/JP00/05210 is a true and complete translation of the above identified International Application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Dated this 2nd day of May, 2001

Full name of the translator: Tadahiko KURITA

Signature of the translator:



Post Office Address: c/o YUASA AND HARA, Section 206,
New Ohtemachi Bldg., 2-1,
Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku,
Tokyo, JAPAN

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13、17-20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲13、17-20は、人体の診断方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iV)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☒ 請求の範囲 1-12 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

これらの請求の範囲には「CF6阻害剤、CF6賦活剤、CF67ゴニストCF67アンタゴニスト、CF6分泌促進物質」が有効成分として記載されているが、それらの物質については、出願時の技術常識を勘案しても、明細書に具体的に開示されているもの以外については、当業者に把握することができないため、有意義な国際調査を行うことができない。

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1~15、17~20に記載の発明は、CF6抗体、CF67ゴニスト等を有効成分とする治療剤、診断剤であるのに対し、請求の範囲16に記載の発明は、CF6又はその部分ポリペプチドの製造方法であり、両者の共通点は、CF6及び／又はその関連物質のみと認められる。しかしながら、CF6ペプチドは、出願人が本願明細書中において認めるとおり公知の物質であるから、当該点をこの出願の技術的特徴点として認めることはできない。したがって、この出願には、二以上の発明があるものと認める。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

PCT REQUEST

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	03.8.00
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.91 (updated 01.07.2000)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Japanese Patent Office (RO/JP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	YCT-515
I	Title of invention	INHIBITOR AND ACTIVATOR FOR COUPLING FACTOR-6 AND USE THEREOF
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	SUNTORY LIMITED
II-5	Address:	1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203 Japan
II-6	State of nationality	JP
II-7	State of residence	JP
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	OSANAI, Tomohiro
III-1-5	Address:	31-1, Aza Muramoto, Oaza Komagoshi, Iwaki-machi, Nakatsugaru-gun, Aomori 036-1322 Japan
III-1-6	State of nationality	JP
III-1-7	State of residence	JP

図2

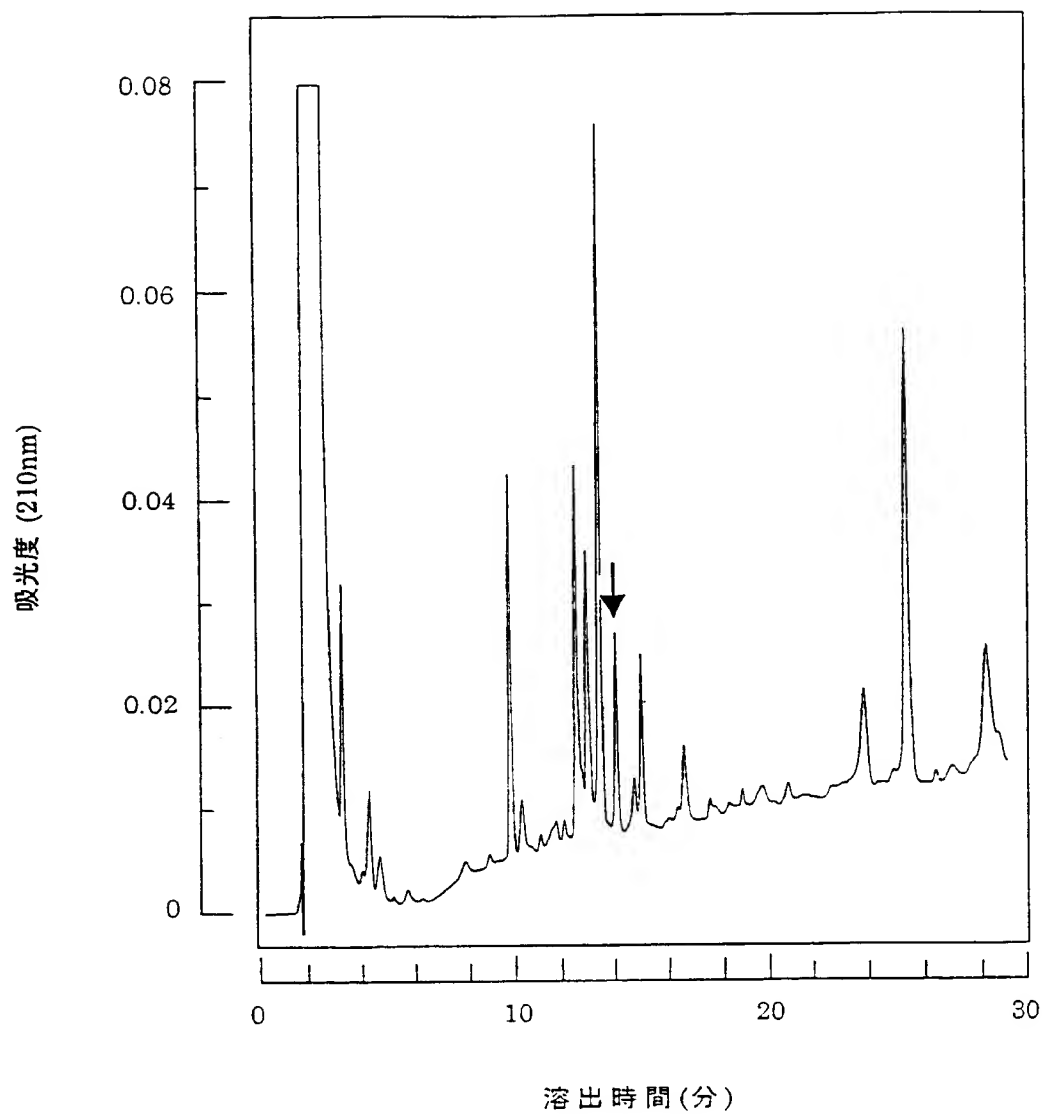


図3

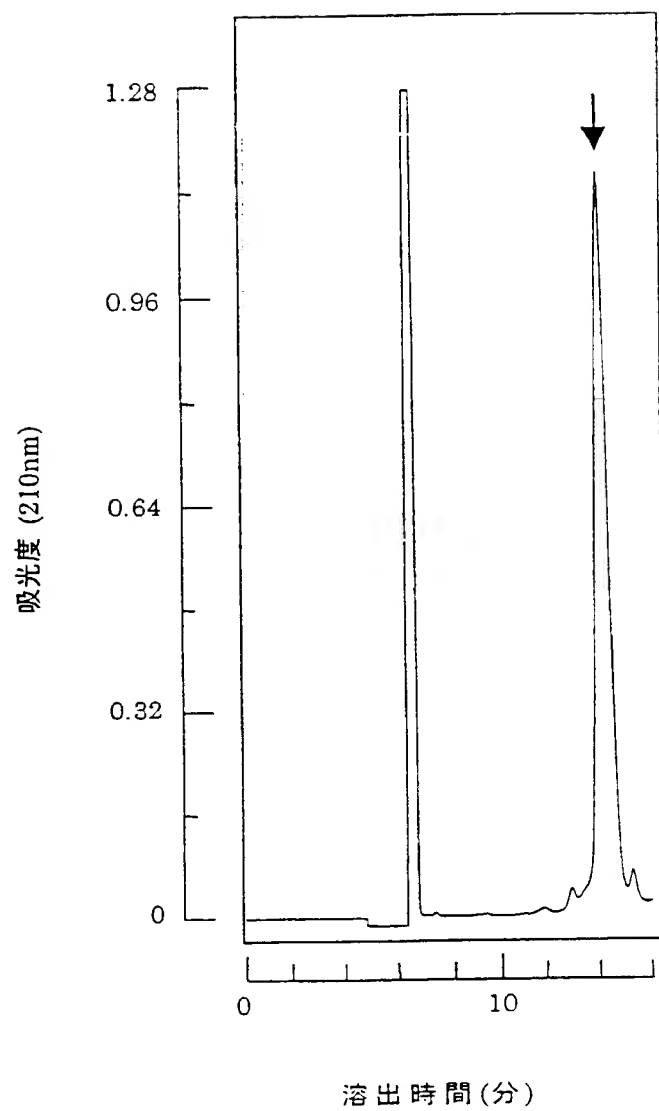


図4

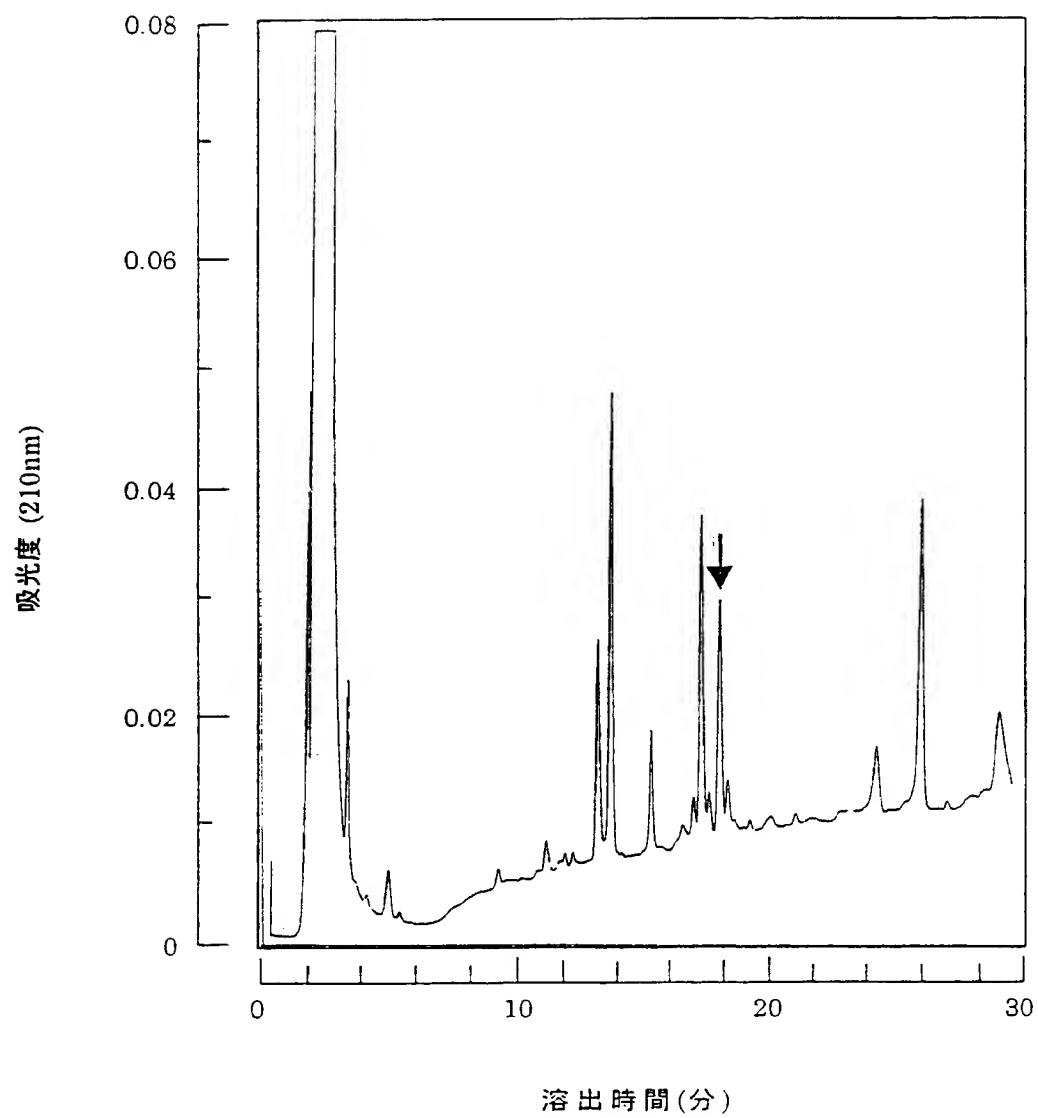


図5

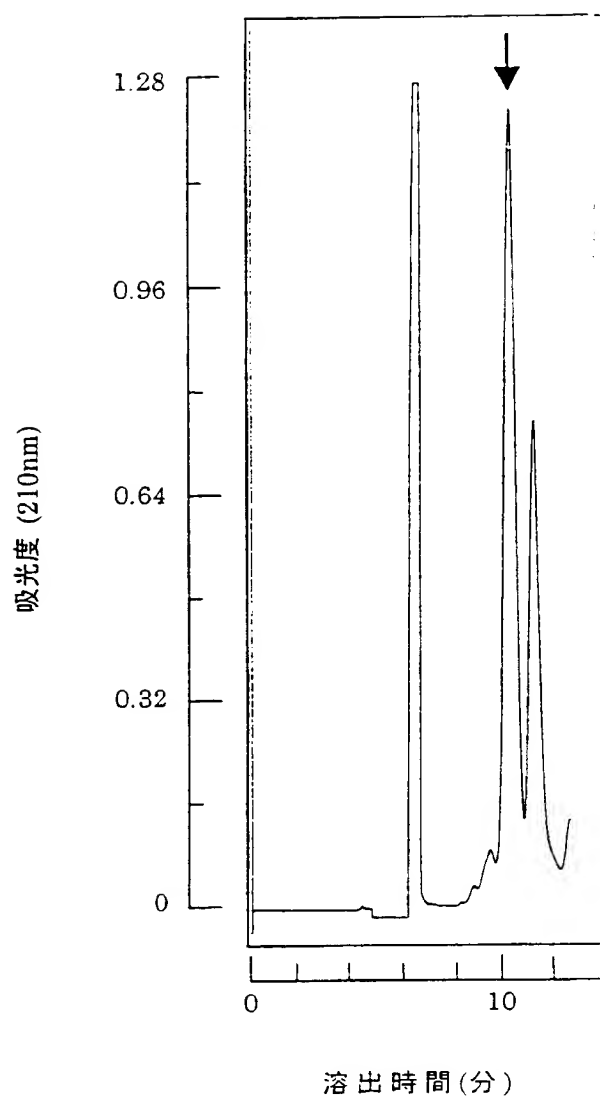


図6

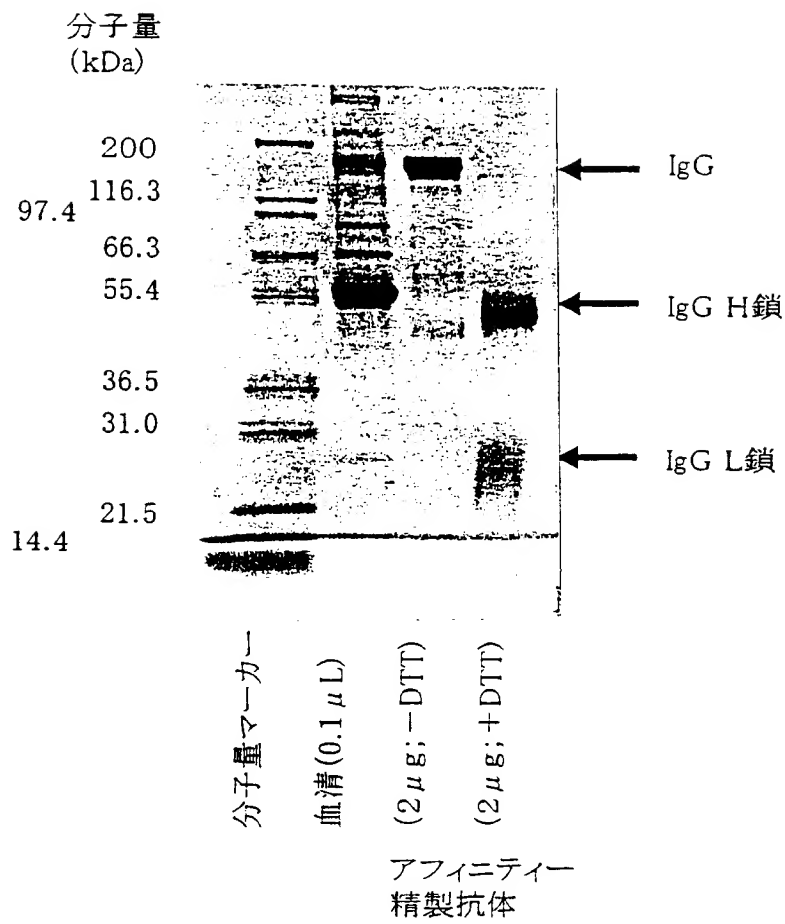


図7

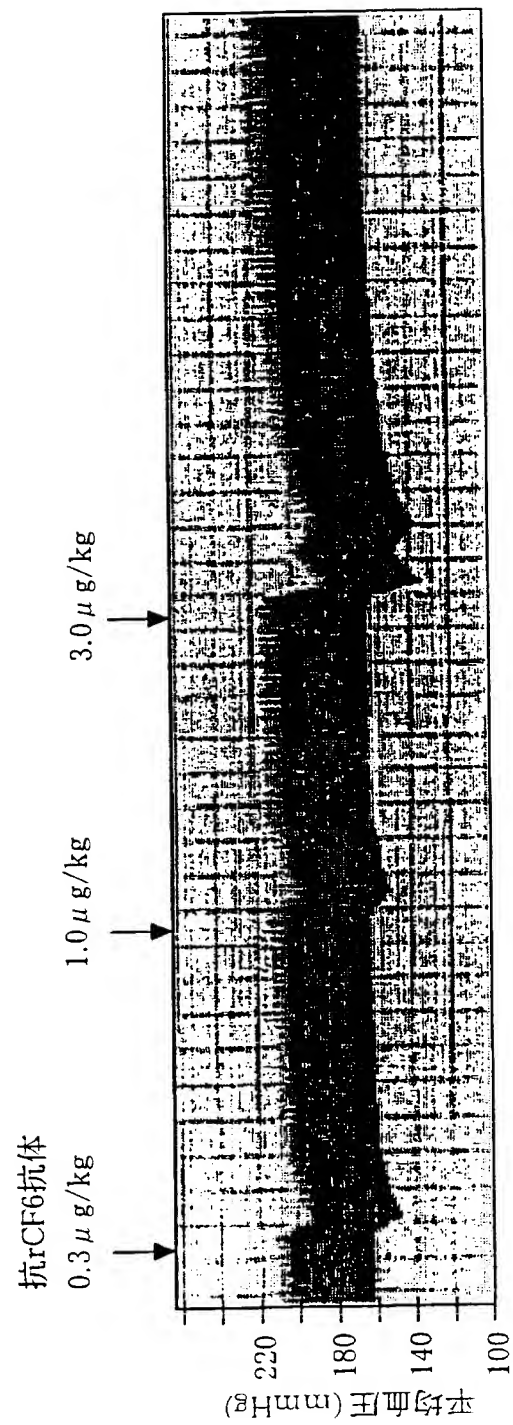


図8

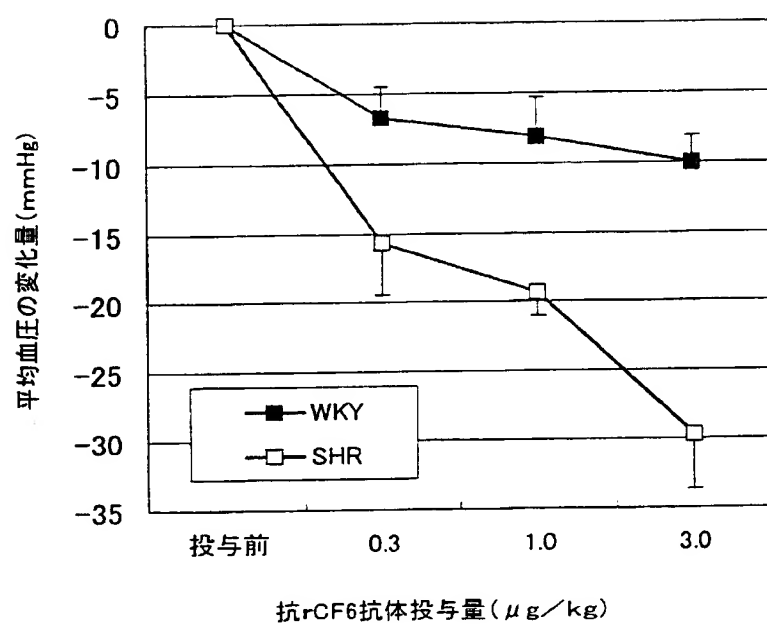


図9

1) ブラジキニン投与(iv)による動脈圧の変化

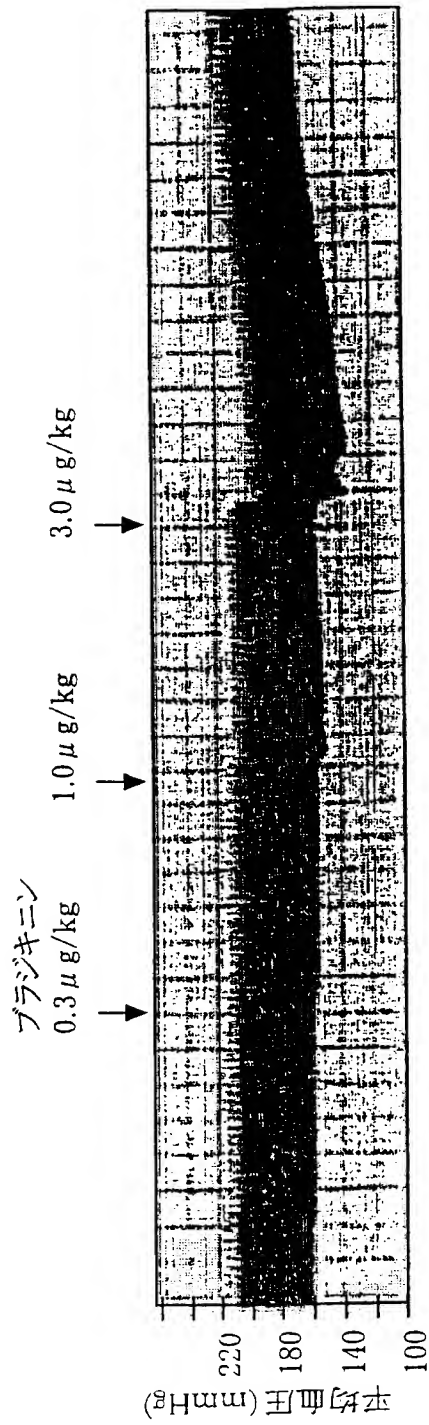
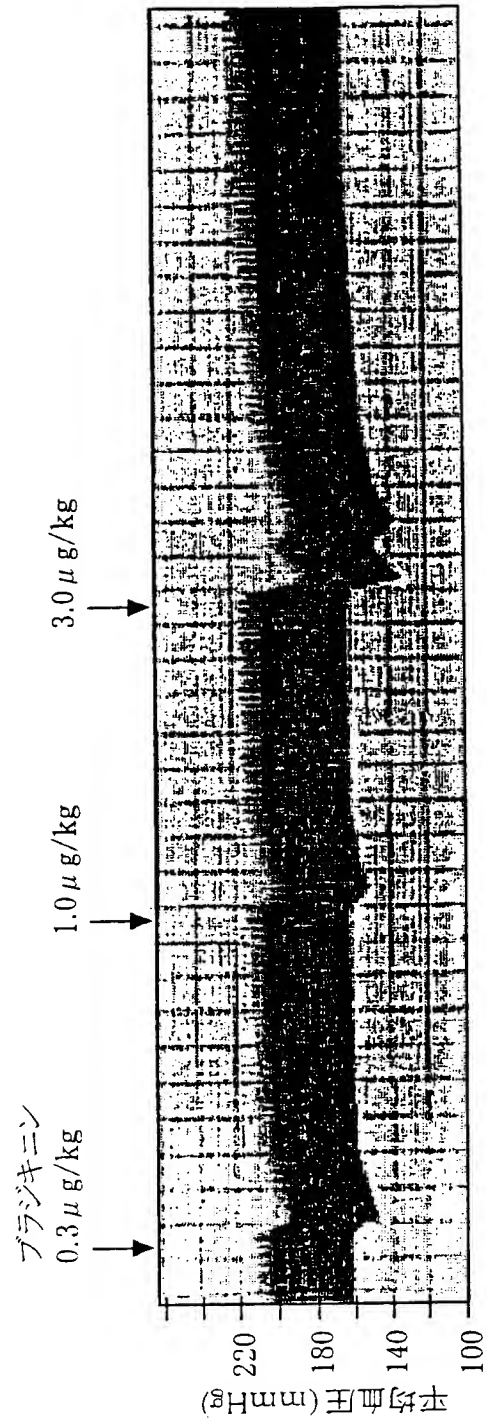
2) 抗rCF6抗体 (3.0 μ g/kg、iv) 投与後、ブラジキニン投与(iv)による動脈圧の変化

図10

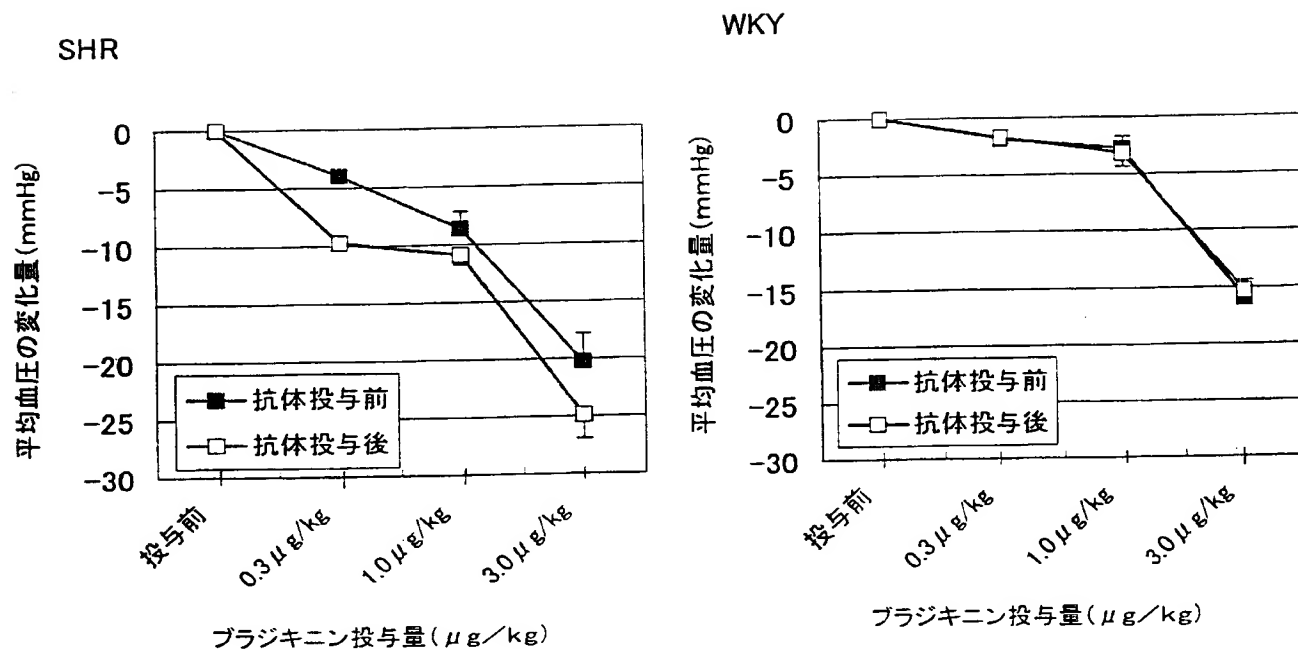


図 11

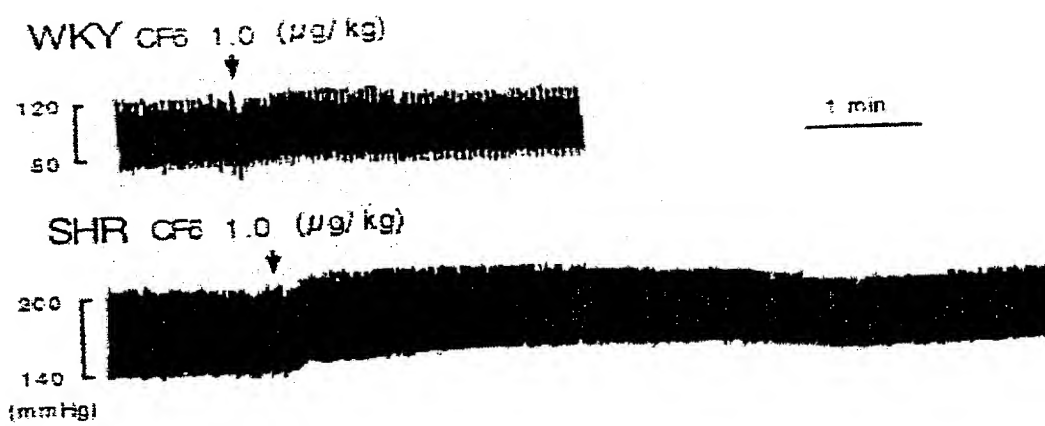


図12

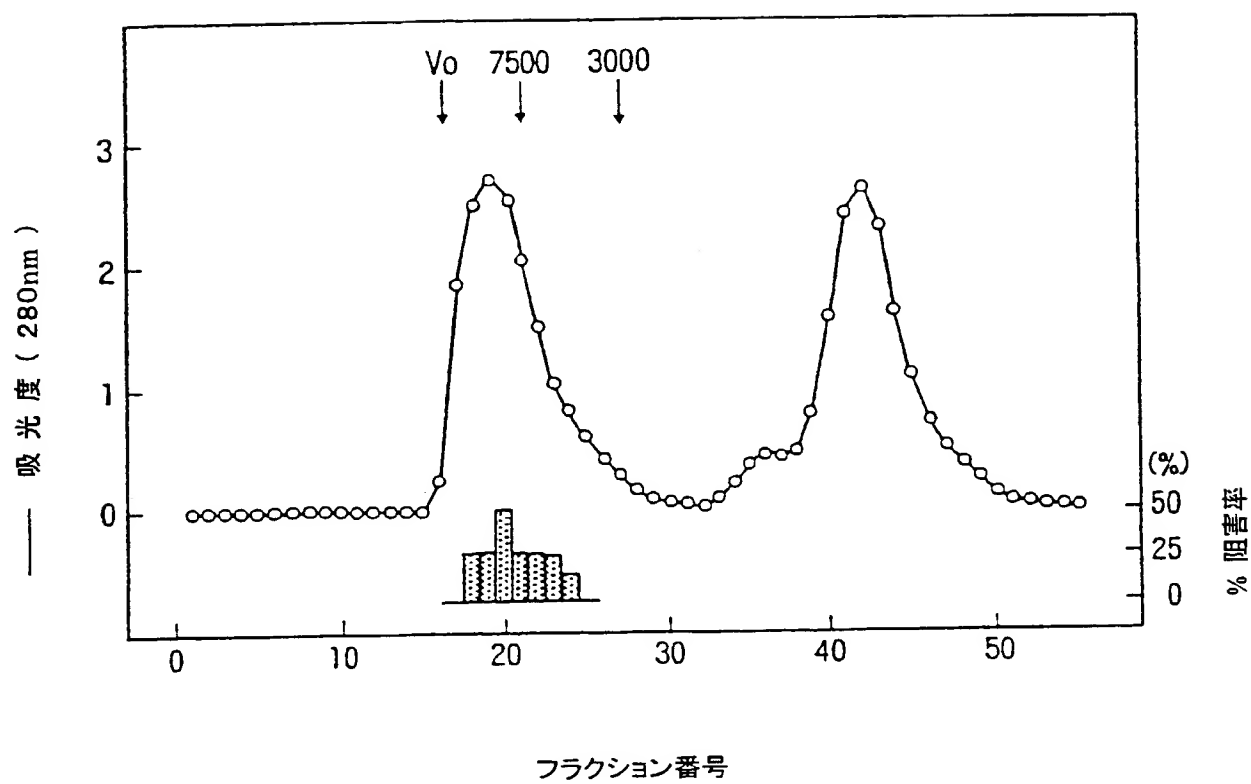


図13

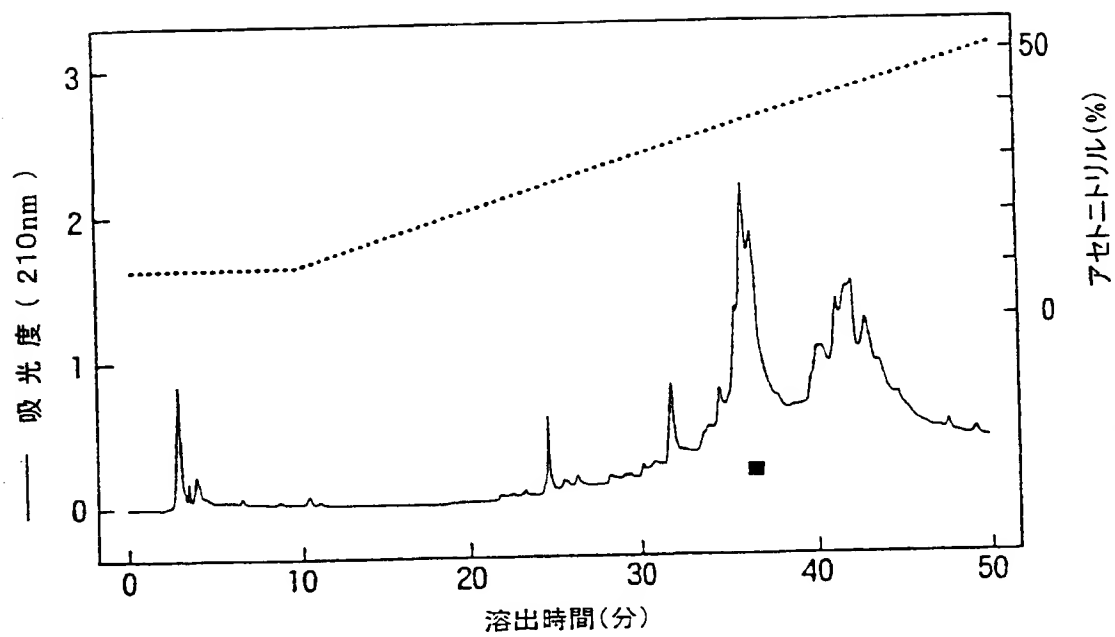


図14

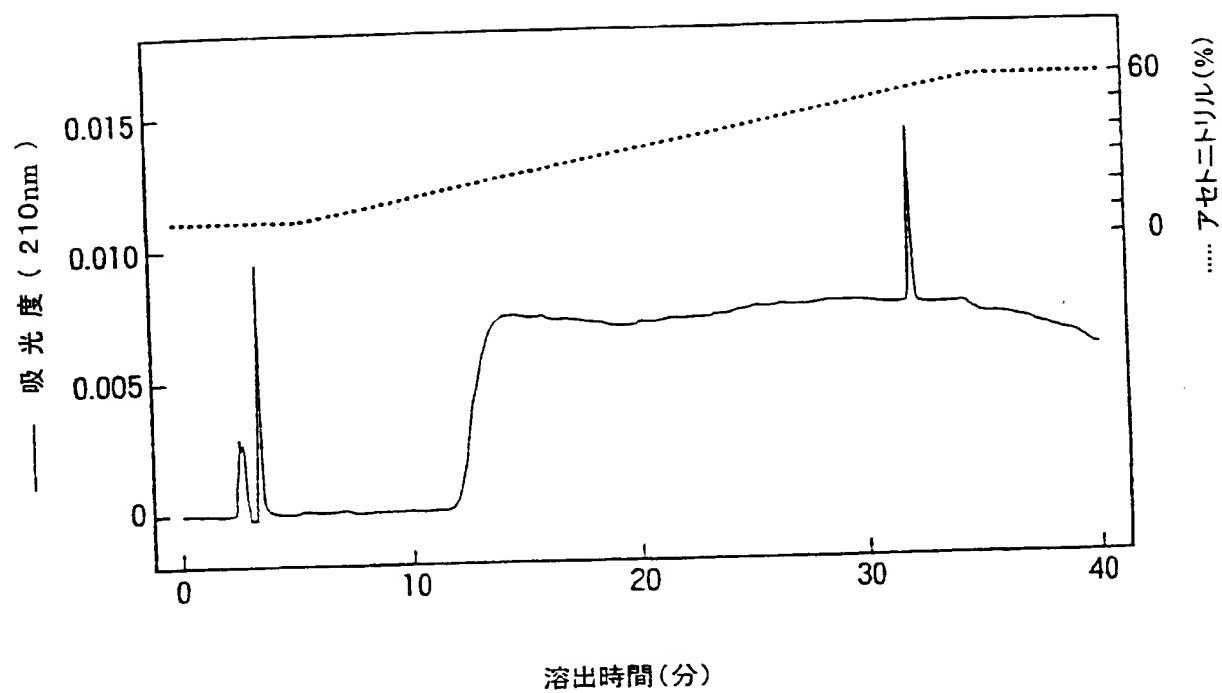


図15

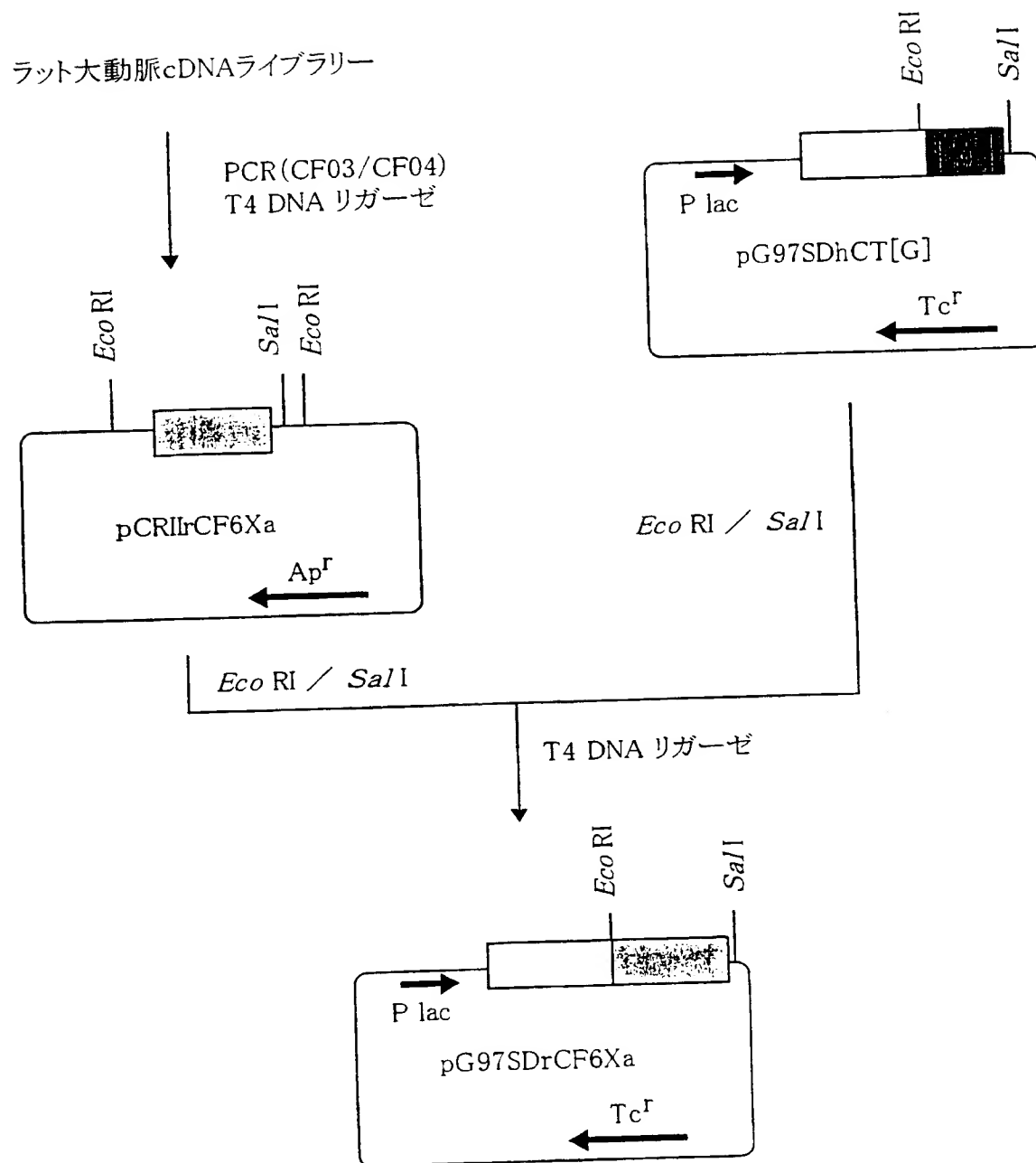
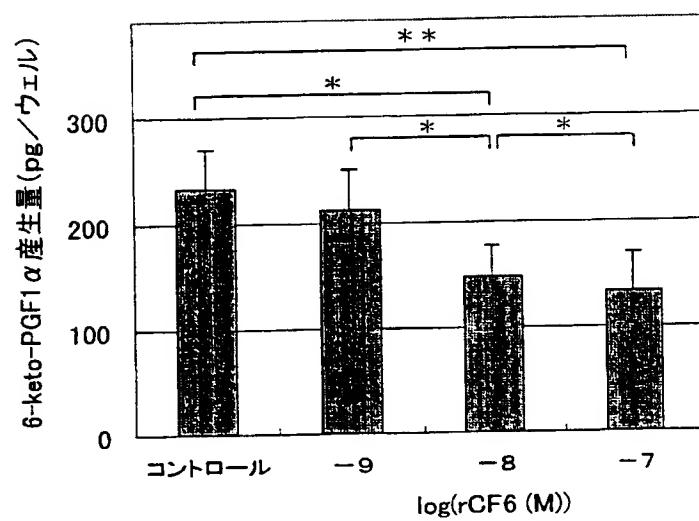


図16



** : $p < 0.02$

* : $p < 0.05$

図17

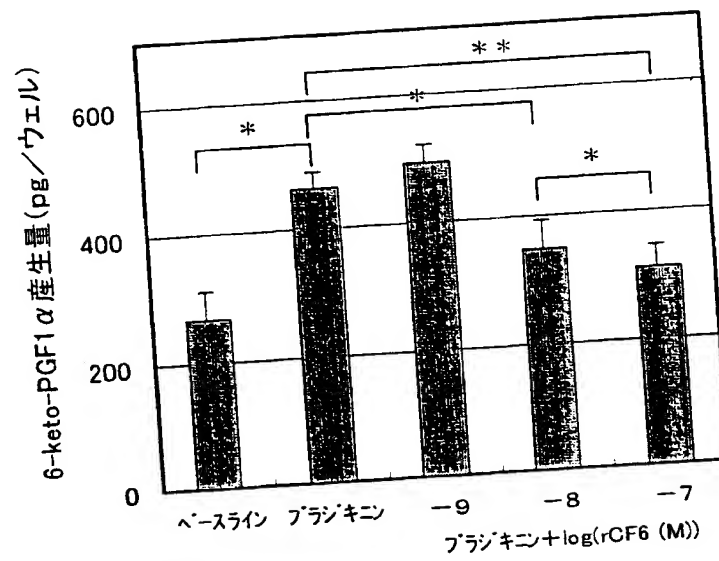
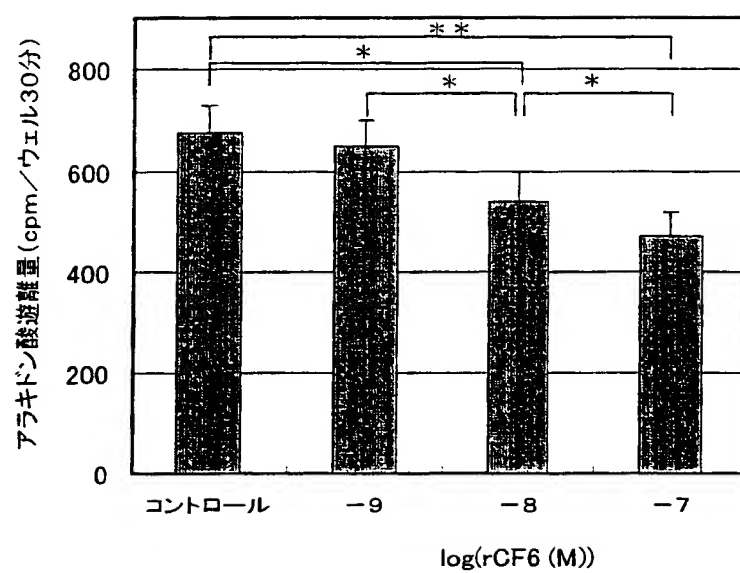


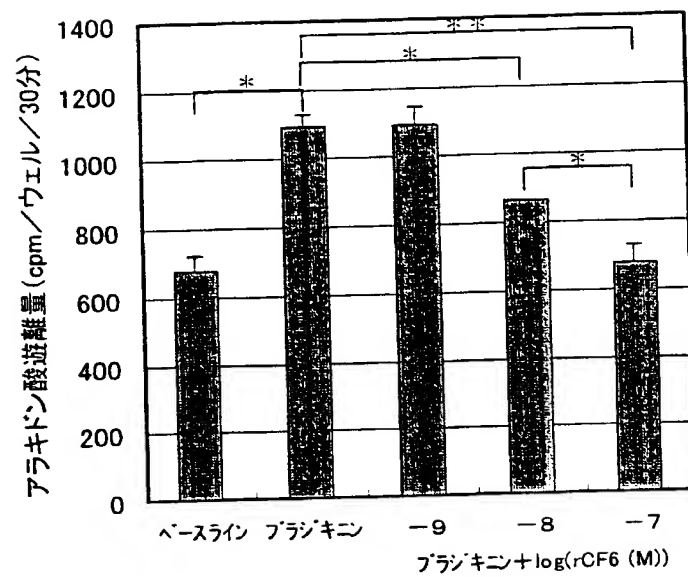
図18



** : $p < 0.02$

* : $p < 0.05$

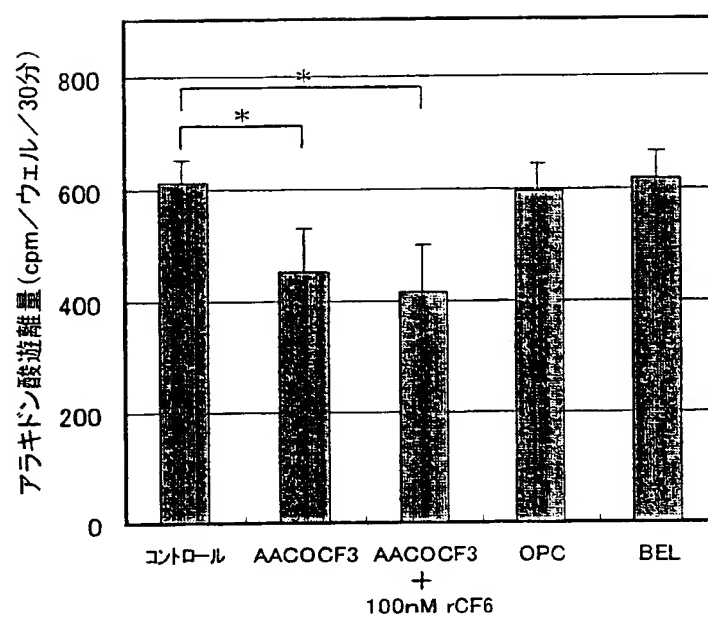
図19



** : $p < 0.01$

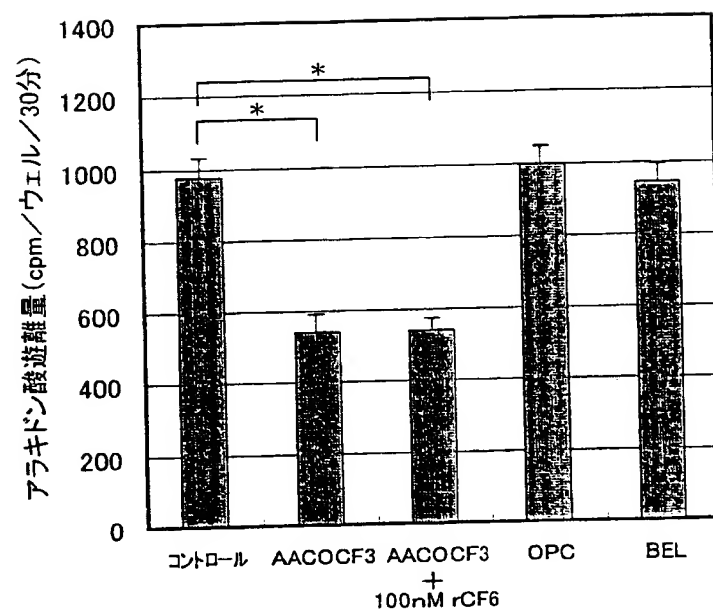
* : $p < 0.05$

図20



* : $p < 0.05$

図21



* : $p < 0.01$

図22

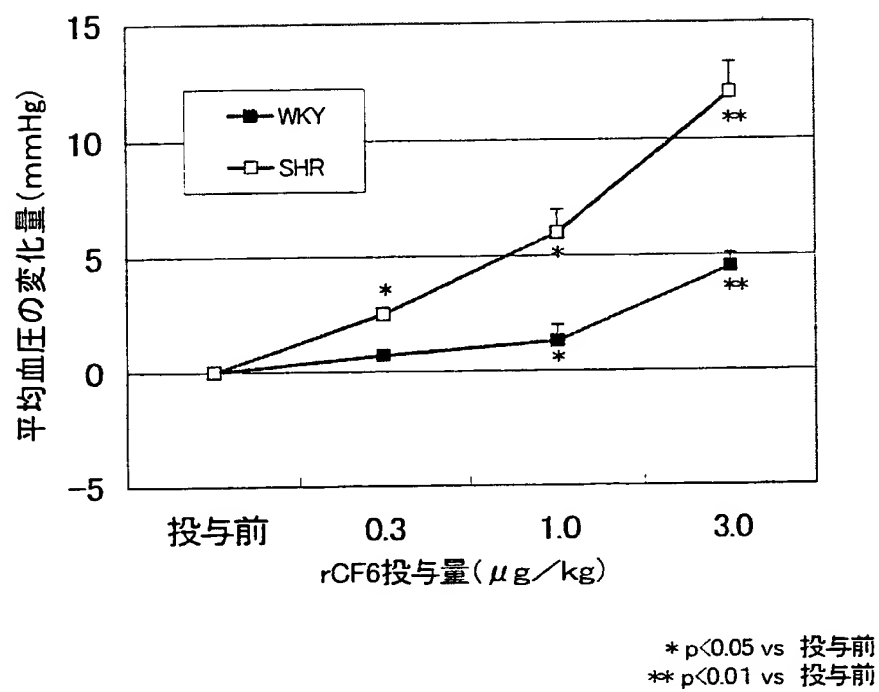


図23

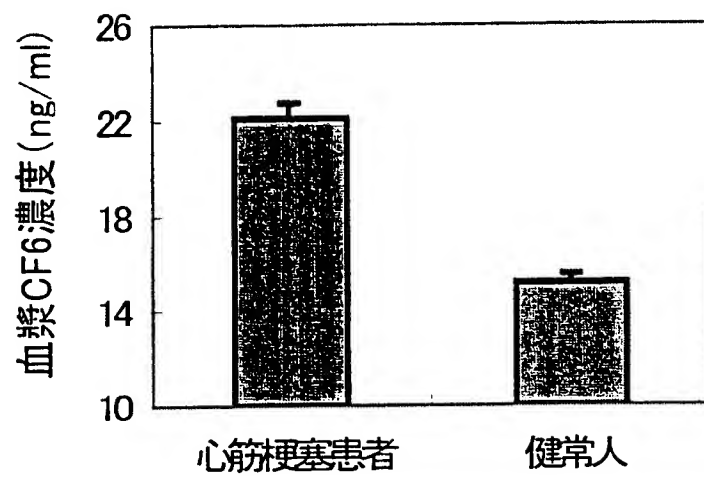


図24

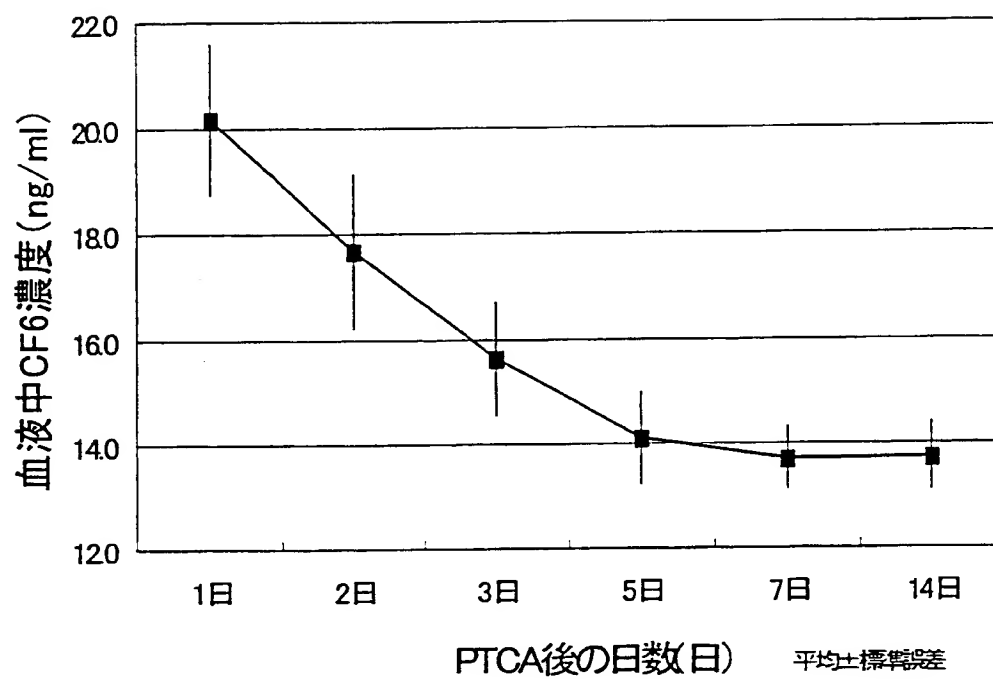
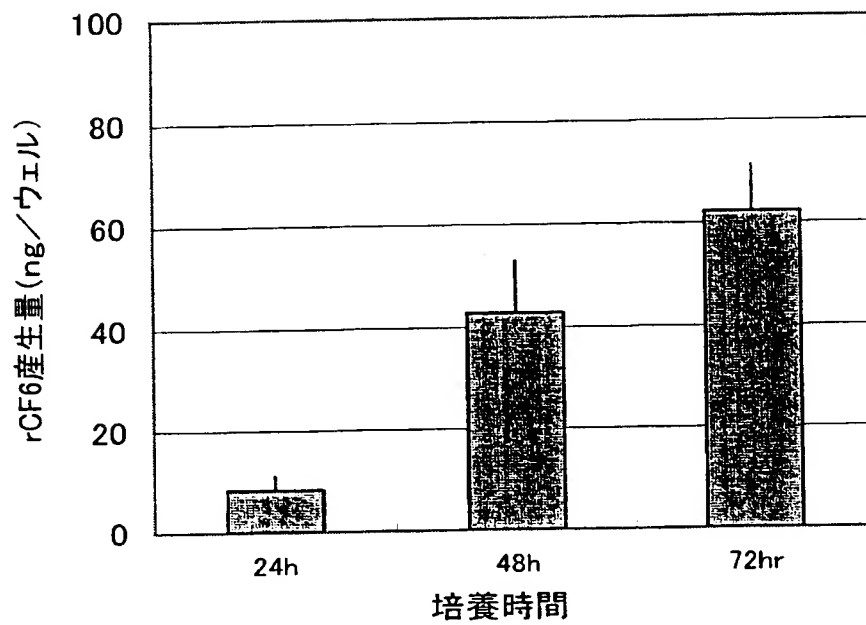


図25



[配列表]

1. 一般情報

(1) 出願人： サントリー株式会社

(2) 発明の名称： カップリングファクター 6 及びその抗体の新規用途

(3) 配列の数： 2 4

2. 配列に関する情報

配列番号： 1

配列の長さ： 7 6

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列：

Asn Lys Glu Leu Asp Pro Ile Gln Lys Leu
Phe Val Asp Lys Ile Arg Glu Tyr Lys Ser
Lys Arg Gln Thr Ser Gly Gly Pro Val Asp
Ala Ser Ser Glu Tyr Gln Gln Glu Leu Glu
Arg Glu Leu Phe Lys Leu Lys Gln Met Phe
Gly Asn Ala Asp Met Asn Thr Phe Pro Thr
Phe Lys Phe Glu Asp Pro Lys Phe Glu Val
Leu Glu Lys Pro Gln Ala

配列番号： 2

配列の長さ： 7 6

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列：

Asn Lys Glu Leu Asp Pro Val Gln Lys Leu

Phe Leu Asp Lys Ile Arg Glu Tyr Lys Ala
 Lys Arg Leu Ala Ser Gly Gly Pro Val Asp
 Thr Gly Pro Glu Tyr Gln Gln Glu Val Asp
 Arg Glu Leu Phe Lys Leu Lys Gln Met Tyr
 Gly Lys Gly Glu Met Asp Lys Phe Pro Thr
 Phe Asn Phe Glu Asp Pro Lys Phe Glu Val
 Leu Asp Lys Pro Gln Ser

配列番号： 3

配列の長さ： 5

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asp Asp Asp Asp Lys

配列番号： 4

配列の長さ： 1 3 9

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列：

Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro

20 25 30

Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser

35 40 45

Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro

50 55 60

Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Glu Ser Asp Leu Pro Glu
 65 70 75 80
 Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp
 85 90 95
 Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro
 100 105 110
 Phe Val Pro Thr Glu Asn Pro Thr Gly Ser Tyr Ser Leu Thr Phe Asn
 115 120 125
 Val Asp Glu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Gln Thr
 130 135

配列番号 : 5

配列の長さ : 97

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp
 1 5 10 15
 Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro
 20 25 30
 Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser
 35 40 45
 Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro
 50 55 60
 Ala Pro Glu Ala Val Pro Asp Ser Leu Leu Asp Ser Asp Leu Pro Glu
 65 70 75 80

Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp

85

90

95

Ala

配列番号： 6

配列の長さ： 23

配列の型：ヌクレオチド

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列： ATGACTGTTCAGAGGATCTTCAG

配列番号： 7

配列の長さ： 27

配列の型：ヌクレオチド

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列： GTCGACTCAGGACTGGGGTTTGTTCGAG

配列番号： 8

配列の長さ： 23

配列の型：ヌクレオチド

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列： ATGATTCTTCAGAGGCTCTTCAG

配列番号： 9

配列の長さ： 28

配列の型：ヌクレオチド

トポロジー：直鎖状

配列の種類： DNA

配列： GTCGACTCAGGCCTGGGGTTTTTCGATG

配列番号： 1 0

配列の長さ： 4 5

配列の型：ヌクレオチド

トポロジー：直鎖状

配列の種類： DNA

配列：

GAATTCGACGATGACGATAAGAATAAGGAACTTGATCCTGTACAG

配列番号： 1 1

配列の長さ： 4 6

配列の型：ヌクレオチド

トポロジー：直鎖状

配列の種類： DNA

配列：

GAATTCGACGATGACGATAAGAATAAGGAACTTGATCCTATACAGA

配列番号： 1 2

配列の長さ： 2 0

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列： Cys Phe Pro Thr Phe Asn Phe Glu Asp Pro

Lys Phe Glu Val Leu Asp Lys Pro Gln Ser

配列番号： 1 3

配列の長さ： 2 0

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Tyr Phe Pro Thr Phe Asn Phe Glu Asp Pro
Lys Phe Glu Val Leu Asp Lys Pro Gln Ser

配列番号： 1 4

配列の長さ： 1 9

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Cys Leu Phe Val Asp Lys Ile Arg Glu Tyr
Lys Ser Lys Arg Gln Thr Ser Gly Gly

配列番号： 1 5

配列の長さ： 1 8

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Leu Phe Val Asp Lys Ile Arg Glu Tyr Lys
Ser Lys Arg Gln Thr Ser Gly Gly

配列番号： 1 6

配列の長さ： 3 9

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asn Lys Glu Leu Asp Pro Val Gln Lys Leu
Phe Leu Asp Lys Ile Arg Glu Tyr Lys Ala

Lys Arg Leu Ala Ser Gly Gly Pro Val Asp

Thr Gly Pro Glu Tyr Gln Gln Glu Val

配列番号： 1 7

配列の長さ： 1 6

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asp Arg Glu Leu Phe Lys Leu Lys Gln Met

Tyr Gly Lys Gly Glu Met

配列番号： 1 8

配列の長さ： 9

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asp Lys Phe Pro Thr Phe Asn Phe Glu

配列番号： 1 9

配列の長さ： 7

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asp Pro Lys Phe Glu Val Leu

配列番号： 2 0

配列の長さ： 5

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asp Lys Pro Gln Ser

配列番号： 2 1

配列の長さ： 4

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Ile Glu Gly Lys

配列番号： 2 2

配列の長さ： 3 1

配列の型： ヌクレオチド

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： DNA

配列： GATCGAGGGACGTAATAAGGAACTTGATCCT

配列番号： 2 3

配列の長さ： 2 6

配列の型： ヌクレオチド

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： DNA

配列： GTCGACTTAGGACTGGGGTTTGTCTGA

配列番号： 2 4

配列の長さ： 8

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Glu Phe Gly Leu Ile Glu Gly Lys